

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-220399

(P2001-220399A)

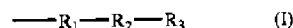
(43)公開日 平成13年8月14日(2001.8.14)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
C 0 7 K 9/00		C 0 7 K 9/00	
1/04		1/04	
C 0 8 F 290/06		C 0 8 F 290/06	
299/02		299/02	
C 1 2 P 21/02		C 1 2 P 21/02	B
審査請求 未請求 請求項の数23 O L (全 31 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2000-353275(P2000-353275)	(71)出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22)出願日	平成12年11月20日(2000.11.20)	(72)発明者	西口 進 滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡 績株式会社総合研究所内
(31)優先権主張番号	特願平11-334852	(72)発明者	柴谷 滋郎 滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡 績株式会社総合研究所内
(32)優先日	平成11年11月25日(1999.11.25)	(72)発明者	戸田 篤志 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株 式会社敦賀バイオ研究所内
(33)優先権主張国	日本 (J P)		
(31)優先権主張番号	特願平11-334853		
(32)優先日	平成11年11月25日(1999.11.25)		
(33)優先権主張国	日本 (J P)		
(31)優先権主張番号	特願平11-342214		
(32)優先日	平成11年12月1日(1999.12.1)		
(33)優先権主張国	日本 (J P)		
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーおよびその用途

(57)【要約】



【課題】糖ペプチドもしくはネオ糖ペプチドの合成に利用することのできるプライマー、および該プライマーを利用した糖ペプチドもしくはネオ糖ペプチドの効率的な製造方法を提供する。

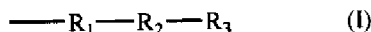
【解決手段】高分子担体上に、一般式(1)(式中、R₁はメチレン基1~20個分の長さを有するリンカーを示し、R₂は特定のプロテアーゼにより開裂できる部位を有するアミノ酸残基あるいはペプチド残基を示し、R₃は前記プロテアーゼにより開裂できる部位を含まない任意のペプチド残基であり、その残基中にOH基あるいは酸アミド基にグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したセリン残基、トレオニン残基、グルタミン残基またはアスパラギン残基を含むペプチド残基、あるいは側鎖官能基にリンカーを介してグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したアミノ酸残基を含むペプチド残基を示す)で表される基が結合していることを特徴とする糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマー。

【化1】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 高分子担体上に、一般式（I）（式中、 R_1 はメチレン基1～20個分の長さを有するリンカーを示し、 R_2 は特定のプロテアーゼにより開裂できる部位を有するアミノ酸残基あるいはペプチド残基を示し、 R_3 は前記プロテアーゼにより開裂できる部位を含まない任意のペプチド残基であり、その残基中にOH基あるいは酸アミド基にグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したセリン残基、トレオニン残基、グルタミン残基またはアスパラギン残基を含むペプチド残基、あるいは側鎖官能基にリンカーを介してグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したアミノ酸残基を含むペプチド残基を示す）で表される基が結合していることを特徴とする糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマー。

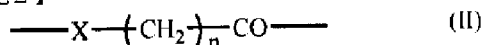
【化1】



【請求項2】 R_3 がアミノ酸残基2～30個よりなるペプチド残基である請求項1記載の糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマー。

【請求項3】 R_1 が一般式（II）（式中、XはO、CH₂、C=OまたはNHを示し、かつXを介して高分子担体と結合しており、nは1～18の整数を示す）で表される基である請求項1または2に記載の糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマー。

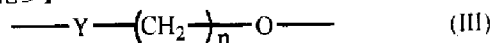
【化2】



【請求項4】 側鎖官能基に結合したリンカーがメチレン基1～20個分の長さを有し、任意の単糖残基が結合したアミノ酸残基がセリン、トレオニン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギンまたはグルタミン残基である請求項1～3のいずれかに記載のネオ糖ペプチド合成用高分子プライマー。

【請求項5】 側鎖官能基に結合したリンカーが一般式（III）（式中、YはO、NHまたはC=Oを示し、かつYを介してアミノ酸残基の側鎖官能基と結合しており、nは1～18の整数を示す）で表される基である請求項1～4のいずれかに記載のネオ糖ペプチド合成用高分子プライマー。

【化3】



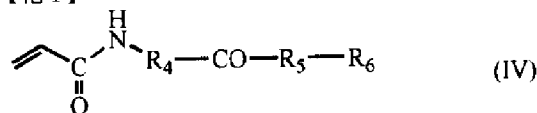
【請求項6】 高分子担体がアクリルアミド類、メタクリルアミド類、アクリル酸類、メタクリル酸類、スチレン類、脂肪酸ビニルエステル類などのビニル化合物の重合体または共重合体である請求項1～5のいずれかに記載の糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマー。

【請求項7】 R_2 が芳香族アミノ酸残基であり、 R_3 が

芳香族アミノ酸を含まない任意のペプチド残基であり、その残基中にOH基あるいは酸アミド基にグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したセリン残基、トレオニン残基、グルタミン残基またはアスパラギン残基を含むペプチド残基、あるいは側鎖官能基にリンカーを介してグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したアミノ酸残基を含むペプチド残基である請求項1～6のいずれかに記載の糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマー。

【請求項8】 一般式（IV）（式中、 R_4 は炭素数1～18のアルキレン基を示し、 R_5 は特定のプロテアーゼにより開裂できる部位を有するアミノ酸残基あるいはペプチド残基を示し、 R_6 は前記プロテアーゼにより開裂できる部位を含まない任意のペプチド残基であり、その残基中にOH基あるいは酸アミド基にグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したセリン残基、トレオニン残基、グルタミン残基またはアスパラギン残基を含むペプチド残基、あるいは側鎖官能基にリンカーを介してグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したアミノ酸残基を含むペプチド残基を示す）で表されることを特徴とするアクリルアミド誘導体。

【化4】

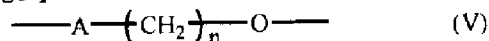


【請求項9】 R_6 がアミノ酸残基2～30個よりなるペプチド残基である請求項8に記載のアクリルアミド誘導体。

【請求項10】 側鎖官能基に結合したリンカーがメチレン基1～20個分の長さを有し、任意の単糖残基が結合したアミノ酸残基がセリン、トレオニン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギンまたはグルタミン残基である請求項8または9に記載のアクリルアミド誘導体。

【請求項11】 側鎖官能基に結合したリンカーが一般式（V）（式中、AはO、NHまたはC=Oを示し、かつAを介してアミノ酸残基の側鎖官能基と結合しており、nは1～18の整数を示す）で表される基である請求項8～10のいずれかに記載のアクリルアミド誘導体。

【化5】



【請求項12】 R_5 が芳香族アミノ酸残基であり、 R_6 が芳香族アミノ酸を含まない任意のペプチド残基であり、その残基中にOH基あるいは酸アミド基にグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したセリン残基、トレオニン残基、グルタミン残基またはアスパラギン残基を含むペプチド残基、あるいは側鎖官能基にリンカーを

介してグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したアミノ酸残基を含むペプチド残基である請求項8～11のいずれかに記載のアクリルアミド誘導体。

【請求項13】 請求項8～11のいずれかに記載の少なくとも1種類のアクリルアミド誘導体および少なくとも1種類のビニル系単量体とを含む共重合体からなることを特徴とする糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマー。

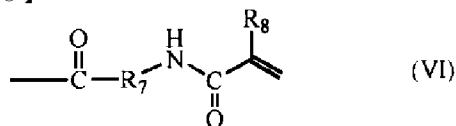
【請求項14】 請求項12に記載の少なくとも1種類のアクリルアミド誘導体および少なくとも1種類のビニル系単量体とを含む共重合体からなることを特徴とする糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマー。

【請求項15】 ビニル系単量体がアクリルアミド類、メタクリルアミド類、アクリル酸類、メタクリル酸類、スチレン類、脂肪酸ビニルエステル類からなる群より選ばれた請求項13記載の糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマー。

【請求項16】 ビニル系単量体がアクリルアミド類、メタクリルアミド類、アクリル酸類、メタクリル酸類、スチレン類、脂肪酸ビニルエステル類からなる群より選ばれた請求項14記載の糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマー。

【請求項17】 アミノ基が一般式(VI)(式中、R₇は炭素数1～18のアルキレン基を示し、R₈はHまたはCH₃を示す)で表される基でアシル化された重合性芳香族アミノ酸誘導体。

【化6】



【請求項18】 糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法であって、(A)請求項1～7および13～16のいずれかに記載の糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、糖ヌクレオチドの存在下に糖転移酵素を作用させることにより、糖ヌクレオチドより糖残基を該糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに転移させる工程、および、(B)工程(A)で得た糖残基が転移した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、R₂中の特定の部位を開裂させることのできるプロテアーゼを作用させることにより糖鎖が伸長した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを遊離させる工程、を含むことを特徴とする糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法。

【請求項19】 糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法であって、(A)請求項1～7および13～16のいずれかに記載の糖ペプチドあるいはネオ糖ペ

プチド合成用高分子プライマーに、糖ヌクレオチドの存在下に糖転移酵素を作用させることにより、糖ヌクレオチドより糖残基を該糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに転移させる工程、(B)工程(A)を1回または2回以上繰り返して糖鎖を伸長させる工程、(C)必要に応じて、副生したヌクレオチド類や未反応の糖ヌクレオチド類を除去する工程、および、(D)工程(A)ないし工程(C)を複数回繰り返した後、複数の糖残基が転移して糖鎖が伸長した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、R₂中の特定の部位を開裂させることのできるプロテアーゼを作用させることにより糖鎖糖鎖が伸長した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを遊離させる工程、を含むことを特徴とする糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法。

【請求項20】 糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法であって、(A)請求項7、14および16のいずれかに記載の糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、糖ヌクレオチドの存在下に糖転移酵素を作用させることにより、糖ヌクレオチドより糖残基を該糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに転移させる工程、および、(B)工程(A)で得た糖残基が転移した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、α-キモトリプシンを作用させ、芳香族アミノ酸残基のカルボキシル基側のペプチド結合を加水分解することにより糖鎖が伸長した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを遊離させる工程、を含むことを特徴とする糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法。

【請求項21】 糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法であって、(A)請求項7、14および16のいずれかに記載の糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、糖ヌクレオチドの存在下に糖転移酵素を作用させることにより、糖ヌクレオチドより糖残基を該糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに転移させる工程、(B)工程(A)を1回または2回以上繰り返して糖鎖を伸長させる工程、(C)必要に応じて、副生したヌクレオチド類や未反応の糖ヌクレオチド類を除去する工程、および、(D)工程(A)ないし工程(C)を複数回繰り返した後、複数の糖残基が転移して糖鎖が伸長した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、α-キモトリプシンを作用させ、芳香族アミノ酸残基のカルボキシル基側のペプチド結合を加水分解することにより糖鎖が伸長した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを遊離させる工程、を含むことを特徴とする糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法。

【請求項22】 糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法であって、(A)請求項8～12のいずれかに記載のアクリルアミド誘導体をペプチド自動合成装

置を利用して得る工程、(B)得られたアクリルアミド誘導体と少なくとも1種類のビニル系単量体を共重合させ、請求項13～16のいずれかに記載の糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーを得る工程、(C)得られた糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、糖ヌクレオチドの存在下に糖転移酵素を作用させることにより、糖ヌクレオチドより、糖残基を該糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに転移させる工程、(D)工程

(C)を1回または2回以上繰り返して糖鎖を伸長させる工程、(E)必要に応じて、副生したヌクレオチド類や未反応の糖ヌクレオチド類を除去する工程、および、(F)工程(C)ないし工程(E)を複数回繰り返した後、複数の糖残基が転移して糖鎖が伸長した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、R₂中の特定の部位を開裂させることのできるプロテアーゼを作用させることにより糖鎖糖鎖が伸長した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを遊離させる工程、を含むことを特徴とする糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法。

【請求項23】 糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法であって、(A)請求項12に記載のアクリルアミド誘導体をペプチド自動合成装置を利用して得る工程、(B)得られたアクリルアミド誘導体と少なくとも1種類のビニル系単量体を共重合させ、請求項14または16に記載の糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーを得る工程、(C)得られた糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、糖ヌクレオチドの存在下に糖転移酵素を作用させることにより、糖ヌクレオチドより、糖残基を該糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに転移させる工程、(D)工程(C)を1回または2回以上繰り返して糖鎖を伸長させる工程、(E)必要に応じて、副生したヌクレオチド類や未反応の糖ヌクレオチド類を除去する工程、および、(F)工程(C)ないし工程(E)を複数回繰り返した後、複数の糖残基が転移して糖鎖が伸長した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、 α -キモトリプシンを作用させ、芳香族アミノ酸残基のカルボキシル基側のペプチド結合を加水分解することにより糖鎖が伸長した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを遊離させる工程、を含むことを特徴とする糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド製造に有用な高分子プライマー、該プ

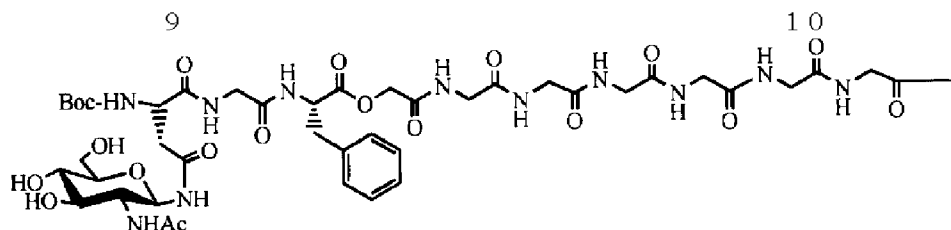
ライマーを利用した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドの製造方法および該プライマーの製造に有用な重合性芳香族アミノ酸誘導体に関する。

【0002】

【従来の技術】糖は核酸や蛋白質と並んで生体を構成する主要な成分であるが、核酸や蛋白質と比べ、その構造あるいは機能はあまりよく理解されていない。糖は、通常糖鎖と呼ばれる重合体を形成し、さらにそれらが蛋白質や脂質と結合して糖蛋白質、糖脂質あるいはプロテオグリカンと総称される極めて複雑な複合分子を形成している。さらに、核酸あるいは蛋白質がその構成単位であるヌクレオチドあるいはアミノ酸が直線的に結合した高分子であるのに対して、糖鎖は分子内に複数の分岐点があるばかりでなく、その構成単位である単糖の結合様式も多様であるため、その構造は核酸や蛋白質と比較にならないほど複雑である。これら構造の複雑さは、この分野の研究を遅らせている大きな原因の一つとなっている

【0003】しかし、近年糖鎖が細胞認識、免疫、分化、受精、老化、ガン化などに関与することが徐々にわかってくるにつれて、非常に注目される研究分野となってきた。このような現状より、天然の構造を有する糖鎖や新規な糖鎖を合成する試みが盛んになされている。また、最近では糖鎖構造が天然には存在しない糖ペプチドや糖鎖構造は天然に存在するものであってもペプチドとの結合様式が天然のものとは異なる糖ペプチドあるいは適当なスペーサーを介して糖鎖とペプチドを結合させた糖ペプチドなどのような非天然型の糖ペプチド(ネオ糖ペプチド)を合成し、天然の糖ペプチドとは異なるあるいは天然の糖ペプチドにはない生理活性を見出そうとする研究も盛んに行われている。例えば、本発明者らは、下記式7(式中、Acはアセチル基を示す)で示されるネオ糖ペプチドは、セレクチンとインテグリン両方に結合できるサイトを有したユニークな化合物であり、該ネオ糖ペプチドのオリゴ糖部分であるシアリルルイスXよりも強くP-セレクチンやL-セレクチンと結合することができ、該ネオ糖ペプチドのペプチド部分であるArg(アルギニン)-Gly(グリシン)-Glu(グルタミン酸)-Ser(セリン)よりも強くインテグリン β 1とそのモノクローナル抗体との結合を阻害することができることを既に報告している(Chem. Commun., 1435, (1999))。上記ネオ糖ペプチドは、ペプチド部分を液相法で有機合成化学的手法により、オリゴ糖部分は糖転移酵素を用いた酵素法により合成しているが、反応を1つ行うごとに分離精製を行っているため、煩雑な操作と長い時間が必要である。

【化7】

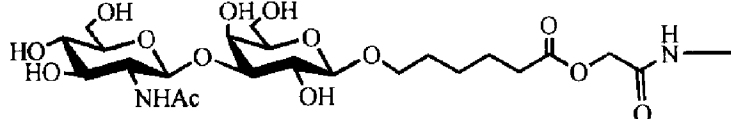


【0009】また、C.-H. Wongらは、固相担体であるアミノ化シリカに結合させる基を下記化9（式中、Acはアセチル基を示す）に改良し、糖転移酵素により糖鎖を伸長させた後、ヒドラジン分解により糖鎖を遊離させる方法

＊的に行うことができたとも報告している(J. Am. Chem. Soc., 116, 11315 (1994))。しかしながら、この方法で得られる糖鎖化合物は糖ペプチドではない。

【0010】

【化9】

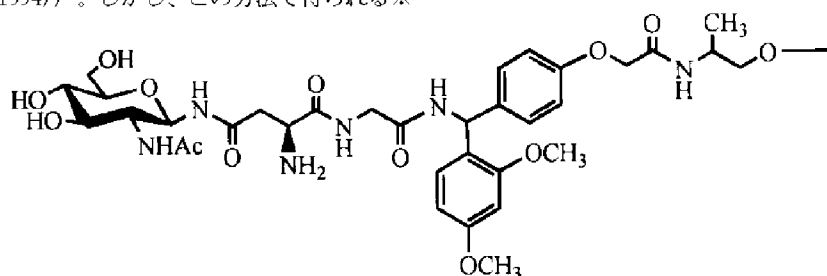


【0011】また、M. Meldal らは、ジアミノ化ポリエチレングリコールのモノおよびジアクリロイル化体の重合体に、下記化10（式中、Acはアセチル基を示す）の基を結合させたものをプライマーとし、糖転移酵素を用いて糖鎖を伸長させた後、トリフロロ酢酸により糖鎖を遊離させる方法を報告しており、糖転移反応もほぼ定量的に進行したと報告している(J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1849 (1994))。しかし、この方法で得られる※

※糖ペプチドのペプチド鎖はAsn（アスパラギン）-Gly（グリシン）であり、糖ペプチドと呼ぶにはあまりに短い。また、C末側のグリシン残基はグリシンアミド残基となっており、場合によってはグリシンアミド残基をグリシン残基へ変換する必要がある。

【0012】

【化10】

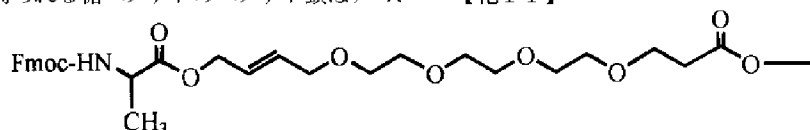


【0013】さらに、C.-H. Wongらは、アミノ化シリカを固相担体として下記化11（式中、Fmocは9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基を示す）の基を導入したものをプライマーとし、これにFmoc-アミノ酸およびFmoc-Thr（βGlcNAc）-OHを用いてペプチド鎖を伸長させ、次いでペプチド鎖上の保護基を脱離させ、その後上述のN-アセチルグルコサミン残基に糖転移酵素を用いて糖鎖を伸長させ、テトラキストリフェニルホスフィンパジウムで処理することにより固相担体上で合成した糖ペプチドを遊離させる方法を報告している(J. Am. Chem. Soc., 119, 8766 (1997))。この方法で得られる糖ペプチドのペプチド鎖はア

★ミノ酸残基8つからなっており、ペプチド鎖としては十分な長さを有しているが、得られた糖ペプチドの最初に固相担体に導入したアミノ酸に対する収率は10%以下であり、十分なものとは言えない。収率が低い原因の一つとして、用いた固相担体がペプチド自動合成にはあまり適したものでないことが挙げられる。ペプチドの自動合成は通常有機溶媒中で行われ、糖転移酵素による糖鎖合成は通常水溶液中で行われるため、それぞれの反応で求められる担体の性質は異なり、一つの担体上でペプチドも糖鎖も自動合成するのは困難である。

【0014】

【化11】



【0015】S. Rothらは、特表平5-500905号 ☆50☆公報に以下のような方法を開示している。まず、糖転移

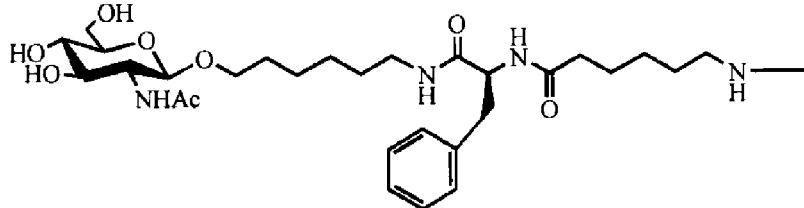
酵素の糖受容体を固相担体に結合させ、これをアフィニティ吸着体とし、この糖受容体と結合することのできる糖転移酵素を含む組織抽出液を接触させることにより、糖転移酵素をアフィニティ吸着体に結合させる。次いで、この糖転移酵素が結合したアフィニティ吸着体をこの糖転移酵素が糖供与体として利用できる糖ヌクレオチドを含む溶液と接触させることにより、糖転移酵素をアフィニティ吸着体から遊離させるとともに糖受容体に糖残基を一つ伸長させる。さらに、この糖残基が一つ伸長した糖受容体と結合することのできる糖転移酵素を含む組織抽出液を接触させ、同様のことを繰り返し所望の糖鎖を固相担体上に合成するというものである。しかしながら、この方法の有用性あるいはネオ糖ペプチド合成への適用を示す具体的なデータは示されておらず、得られ*

*た糖鎖を固相担体から遊離させる方法も開示されていない。

【0016】さらに、本発明者らがポリアクリルアミドのアミド態窒素原子に、下記化12(式中、Acはアセチル基を示す)に示した基を結合させたものをプライマーとし、糖転移酵素を用いて糖鎖を伸長させた後、 α -キモトリプシンの加水分解作用を利用して伸長させた糖鎖を切り出す方法を報告している(Tetrahedron Lett., 35, 5657 (1994))。しかしながら、本方法で得られるのは6-アミノヘキサノール配糖体であり、糖ペプチドではない。

【0017】

【化12】



【0018】本発明の糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用プライマーの合成には本発明のアクリルアミド誘導体が有用であるが、アクリロイル基がスペーサーを介してN末端のアミノ酸残基のアミノ基に結合したような糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドはこれまでに知られてはいない。D. C. Jacksonらはアクリロイル基がアミノヘキサノイル基を介してN末端のアミノ酸残基のアミノ基に結合したようなペプチド誘導体を(J. Am. Chem. Sci., 119, 1183 (1997))、遠藤らはアクリロイル基がアミノラウリロイル基を介してN末端のアミノ酸残基のアミノ基に結合したようなペプチド誘導体(J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem., 35, 1679 (1998))を報告している。また、これらの誘導体は一旦アミノヘキサノイル化あるいはアミノラウリロイル化されたペプチドを合成した後に、アクリロイル化という方法で得ている。本発明のアクリルアミド誘導体の合成には、重合性芳香族アミノ酸誘導体が有用であるが、これまでに知られている重合性アミノ酸誘導体としては、N-アクリロイルフェニルアラニン、N-アクリロイルバリンなどがあるが、これらはいずれもアミノ酸のアミノ基をアクリル酸クロリドなどで直接アクリロイル化したものであり、アクリロイル基とアミノ酸のアミノ基との間にスペーサーはない。

【0019】

【発明が解決しようとする課題】上述したように、これまでに種々のペプチド鎖を有する糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを合成するためのプライマーや該プライマーを利用した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドの製造方法は知られていない。本発明の目的は、糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドの合成に利用できるプライマーお※50

※よび該プライマーを利用した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドの製造方法を提供することにある。また、該プライマーの合成に有用な重合性芳香族アミノ酸誘導体を提供することにある。

【0020】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記問題点を解決するために鋭意検討した結果、新規な糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用プライマーを合成し、これに適当な糖ヌクレオチド類の共存下、糖転移酵素を作用させることにより、糖ヌクレオチド類より該プライマーに糖残基を転移させ、適当な回数この糖転移反応を繰り返した後、必要に応じて副生したヌクレオチド類や未反応の糖ヌクレオチド類などを除去し、特定のプロテアーゼを該プライマーに作用させ、糖鎖が伸長した該プライマーより糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを遊離させることにより、上記問題点を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0021】すなわち、本発明は以下のような構成からなる。

(1) 高分子担体上に、一般式(I)(式中、R₁はメチレン基1~20個分の長さを有するリンカーを示し、R₂は特定のプロテアーゼにより開裂できる部位を有するアミノ酸残基あるいはペプチド残基を示し、R₃は前記プロテアーゼにより開裂できる部位を含まない任意のペプチド残基であり、その残基中にOH基あるいは酸アミド基にグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したセリン残基、トレオニン残基、グルタミン残基またはアスパラギン残基を含むペプチド残基、あるいは側鎖官能基にリンカーを介してグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したアミノ酸残基を含むペプチド残基を示

す)で表される基が結合していることを特徴とする糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマー。

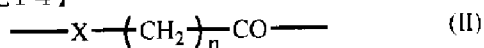
【化13】



(2) R₃がアミノ酸残基2~30個よりなるペプチド残基である(1)の糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマー。

(3) R₁が一般式(II)(式中、XはO、CH₂、C=OまたはNHを示し、かつXを介して高分子担体と結合しており、nは1~18の整数を示す)で表される基である(1)または(2)の糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマー。

【化14】



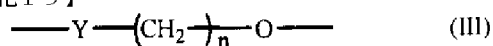
(4) 側鎖官能基に結合したリンカーがメチレン基1~20個分の長さを有し、任意の単糖残基が結合したアミノ酸残基がセリン、トレオニン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギンまたはグルタミン残基である(1)~(3)のいずれかのネオ糖ペプチド合成用高分子プライマー。

(5) 側鎖官能基に結合したリンカーが一般式(III)

(式中、YはO、NHまたはC=Oを示し、かつYを介してアミノ酸残基の側鎖官能基と結合しており、nは1~18の整数を示す)で表される基である(1)~

(4)のいずれかのネオ糖ペプチド合成用高分子プライマー。

【化15】



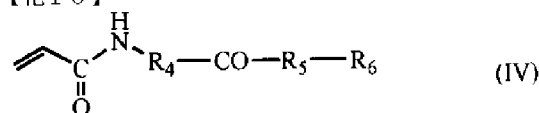
(6) 高分子担体がアクリルアミド類、メタクリルアミド類、アクリル酸類、メタクリル酸類、スチレン類、脂肪酸ビニルエステル類などのビニル化合物の重合体または共重合体である(1)~(5)のいずれかの糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマー。

(7) R₂が芳香族アミノ酸残基であり、R₃が芳香族アミノ酸を含まない任意のペプチド残基であり、その残基中にOH基あるいは酸アミド基にグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したセリン残基、トレオニン残基、グルタミン残基またはアスパラギン残基を含むペプチド残基、あるいは側鎖官能基にリンカーを介してグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したアミノ酸残基を含むペプチド残基である(1)~(6)のいずれかの糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマー。

(8) 一般式(IV)(式中、R₄は炭素数1~18のアルキレン基を示し、R₆は特定のプロテアーゼにより開裂できる部位を有するアミノ酸残基あるいはペプチド残基を示し、R₆は前記プロテアーゼにより開裂できる部

位を含まない任意のペプチド残基であり、その残基中にOH基あるいは酸アミド基にグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したセリン残基、トレオニン残基、グルタミン残基またはアスパラギン残基を含むペプチド残基、あるいは側鎖官能基にリンカーを介してグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したアミノ酸残基を含むペプチド残基を示す)で表されることを特徴とするアクリルアミド誘導体。

【化16】

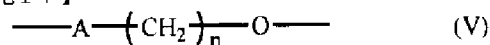


(9) R₆がアミノ酸残基2~30個よりなるペプチド残基である(8)のアクリルアミド誘導体。

(10) 側鎖官能基に結合したリンカーがメチレン基1~20個分の長さを有し、任意の単糖残基が結合したアミノ酸残基がセリン、トレオニン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギンまたはグルタミン残基である(8)または(9)のアクリルアミド誘導体。

(11) 側鎖官能基に結合したリンカーが一般式(V)(式中、AはO、NHまたはC=Oを示し、かつAを介してアミノ酸残基の側鎖官能基と結合しており、nは1~18の整数を示す)で表される基である(8)~(10)のいずれかのアクリルアミド誘導体。

【化17】



(12) R₅が芳香族アミノ酸残基であり、R₆が芳香族アミノ酸を含まない任意のペプチド残基であり、その残基中にOH基あるいは酸アミド基にグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したセリン残基、トレオニン残基、グルタミン残基またはアスパラギン残基を含むペプチド残基、あるいは側鎖官能基にリンカーを介してグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したアミノ酸残基を含むペプチド残基である(8)~(11)のいずれかのアクリルアミド誘導体。

(13) (8)~(11)のいずれかの少なくとも1種類のアクリルアミド誘導体および少なくとも1種類のビニル系単量体とを含む共重合体からなることを特徴とする糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマー。

(14) (12)の少なくとも1種類のアクリルアミド誘導体および少なくとも1種類のビニル系単量体とを含む共重合体からなることを特徴とする糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマー。

(15) ビニル系単量体がアクリルアミド類、メタクリルアミド類、アクリル酸類、メタクリル酸類、スチレン類、脂肪酸ビニルエステル類からなる群より選ばれる

(13)の糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高

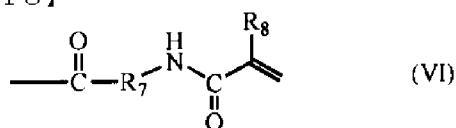
分子プライマー。

(16) ビニル系単量体がアクリルアミド類、メタクリルアミド類、アクリル酸類、メタクリル酸類、スチレン類、脂肪酸ビニルエステル類からなる群より選ばれる

(14) の糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマー。

(17) アミノ基が一般式(VI)(式中、 R_7 は炭素数1~18のアルキレン基を示し、 R_8 はHまたは CH_3 を示す)で表される基でアシル化された重合性芳香族アミノ酸誘導体。

【化18】



(18) 糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法であって、(A)(1)~(7)および(13)~(16)のいずれかの糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、糖ヌクレオチドの存在下に糖転移酵素を作用させることにより、糖ヌクレオチドより糖残基を該糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに転移させる工程、および、(B)工程(A)で得た糖残基が転移した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、 R_2 中の特定の部位を開裂させることのできるプロテアーゼを作用させることにより糖鎖が伸長した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを遊離させる工程、を含むことを特徴とする糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法。

(19) 糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法であって、(A)(1)~(7)および(13)~(16)のいずれかの糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、糖ヌクレオチドの存在下に糖転移酵素を作用させることにより、糖ヌクレオチドより糖残基を該糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに転移させる工程、(B)工程

(A)を1回または2回以上繰り返して糖鎖を伸長させる工程、(C)必要に応じて、副生したヌクレオチド類や未反応の糖ヌクレオチド類を除去する工程、および、(D)工程(A)ないし工程(C)を複数回繰り返した後、複数の糖残基が転移して糖鎖が伸長した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、 R_2 中の特定の部位を開裂させることのできるプロテアーゼを作用させることにより糖鎖糖鎖が伸長した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを遊離させる工程、を含むことを特徴とする糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法。

(20) 糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法であって、(A)(7)、(14)および(16)のいずれかの糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用

高分子プライマーに、糖ヌクレオチドの存在下に糖転移酵素を作用させることにより、糖ヌクレオチドより糖残基を該糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに転移させる工程、および、(B)工程

(A)で得た糖残基が転移した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、 α -キモトリプシンを作用させ、芳香族アミノ酸残基のカルボキシル基側のペプチド結合を加水分解することにより糖鎖が伸長した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを遊離させる工程、を含むことを特徴とする糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法。

(21) 糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法であって、(A)(7)、(14)および(16)のいずれかの糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、糖ヌクレオチドの存在下に糖転移酵素を作用させることにより、糖ヌクレオチドより糖残基を該糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに転移させる工程、(B)工程(A)を1回または2回以上繰り返して糖鎖を伸長させる工程、

(C)必要に応じて、副生したヌクレオチド類や未反応の糖ヌクレオチド類を除去する工程、および、(D)工程(A)ないし工程(C)を複数回繰り返した後、複数の糖残基が転移して糖鎖が伸長した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、 α -キモトリプシンを作用させ、芳香族アミノ酸残基のカルボキシル基側のペプチド結合を加水分解することにより糖鎖が伸長した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを遊離させる工程、を含むことを特徴とする糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法。

(22) 糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法であって、(A)(8)~(12)のいずれかに記載のアクリルアミド誘導体をペプチド自動合成装置を利用して得る工程、(B)得られたアクリルアミド誘導体と少なくとも1種類のビニル系単量体を共重合させ、

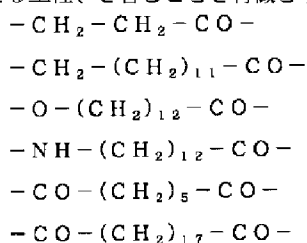
(13)~(16)のいずれかの糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーを得る工程、

(C)得られた糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、糖ヌクレオチドの存在下に糖転移酵素を作用させることにより、糖ヌクレオチドより、糖残基を該糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに転移させる工程、(D)工程(C)を1回または2回以上繰り返して糖鎖を伸長させる工程、

(E)必要に応じて、副生したヌクレオチド類や未反応の糖ヌクレオチド類を除去する工程、および、(F)工程(C)ないし工程(E)を複数回繰り返した後、複数の糖残基が転移して糖鎖が伸長した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、 R_2 中の特定の部位を開裂させることのできるプロテアーゼを作用させることにより糖鎖糖鎖が伸長した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを遊離させる工程、を含むことを特徴

とする糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法。

(23) 糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法であって、(A) (12) のアクリルアミド誘導体をペプチド自動合成装置を利用して得る工程、(B) 得られたアクリルアミド誘導体と少なくとも1種類のビニル系単量体を共重合させ、(14) または(16) の糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーを得る工程、(C) 得られた糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、糖ヌクレオチドの存在下に糖転移酵素を作用させることにより、糖ヌクレオチドより、糖残基を該糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに転移させる工程、(D) 工程(C) を1回または2回以上繰り返して糖鎖を伸長させる工程、(E) 必要に応じて、副生したヌクレオチド類や未反応の糖ヌクレオチド類を除去する工程、および、(F) 工程(C) ないし工程(E) を複数回繰り返した後、複数の糖残基が転移して糖鎖が伸長した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、 α -キモトリプシンを作用させ、芳香族アミノ酸残基のカルボキシル基側のペプチド結合を加水分解することにより糖鎖が伸長した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを遊離させる工程、を含むことを特徴とする*



【0024】 R_2 の特定のプロテアーゼにより開裂できる部位を有するアミノ酸残基あるいはペプチド残基としては、例えば特定のプロテアーゼが α -キモトリプシンのときにはフェニルアラニン、トリプトファン、チロシンなどの芳香族アミノ酸残基、プロリン特異的プロテアーゼのときにはプロリン残基、トリプシンのときはアルギニンやリジンなどの塩基性アミノ酸残基、ファクターXaのときはIle (イソロイシン)-Glu (グルタミン酸) またはAsp (アスパラギン酸)-Gly (グリシン)-Arg (アルギニン) 残基、エンテロキナーゼのときはAsp (アスパラギン酸)-Asp (アスパラギン酸)-Asp (アスパラギン酸)-Lys (リジン) 残基などが挙げられる。

【0025】 R_3 の前記プロテアーゼにより開裂できる部位を含まない任意のペプチド残基としては、前記プロテアーゼにより開裂できる部位を有するアミノ酸残基あるいはペプチド残基を除く任意のアミノ酸残基から構成されていれば特に制限はなく、また、構成するアミノ酸残基は分子内にアミノ基とカルボキシル基を有するもの※50

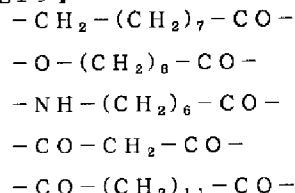
* 糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法。

【0022】

【発明の実施の形態】本発明の糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用プライマーは、高分子担体上に上記一般式(I) で表される基が結合している。式中、 R_1 はメチレン基1~20個分の長さを有するリンカーを示し、 R_2 は特定のプロテアーゼにより開裂できる部位を有するアミノ酸残基あるいはペプチド残基を示し、 R_3 は前記プロテアーゼにより開裂できる部位を含まない任意のペプチド残基であり、その残基中にOH基あるいは酸アミド基にグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したセリン残基、トレオニン残基、グルタミン残基またはアスパラギン残基を含むペプチド残基、あるいは側鎖官能基にリンカーを介してグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したアミノ酸残基を含むペプチド残基を示す。 R_1 のメチレン基1~20個分の長さを有するリンカーとしては、例えば上記一般式(II) (式中、XはO、 CH_2 、 $\text{C}=\text{O}$ またはNHを示し、かつXを介して高分子担体と結合しており、nは1~18の整数を示す) で表される基が例示され、具体的には下記に示すようなものが例示される。

【0023】

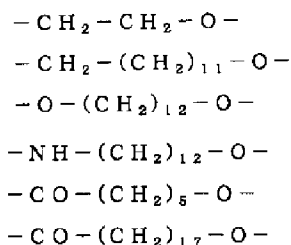
【化19】



※であれば特に制限はなく、Gly (グリシン)、Ala (アラニン)、Val (バリン)、Leu (ロイシン)、Ile (イソロイシン)、Tyr (チロシン)、Trp (トリプトファン)、Glu (グルタミン酸)、Asp (アスパラギン酸)、Lys (リジン)、Arg (アルギニン)、His (ヒスチジン)、Cys (システイン)、Met (メチオニン)、Ser (セリン)、Thr (トレオニン)、Asn (アスパラギン)、Gln (グルタミン) あるいはPro (プロリン) 残基などの α -アミノ酸残基あるいは β -Ala残基のような β -アミノ酸残基などが例示される。また、アミノ酸残基はD体、L体いずれでもよいが、L体の方が好ましい。さらに、上述したアミノ酸残基2~30個からなるペプチド残基が好ましい。4~20個からなるペプチド残基がさらに好ましい。リンカーを介してグリコシド結合で単糖残基を結合させる側鎖官能基を有するアミノ酸残基としては、リンカーを介してグリコシド結合で単糖残基を結合させることのできる側鎖官能基を有するものであれば特に制限はないが、Ser、Thr、Lys、Asp、Glu、AsnまたはGln残基が好ましい。

【0026】アミノ酸残基の側鎖官能基にリンカーを介してグリコシド結合した単糖残基としては、特に制限はないが、ガラクトース残基、マンノース残基、N-アセチルグルコサミン残基、N-アセチルガラクトサミン残基、グルコース残基、シアル酸残基などが例示され、これら単糖残基は α 結合、 β 結合いずれの結合様式で結合していても構わない。ここで、シアル酸とはノイラミン酸のアシル誘導体の総称であり、N-アセチルノイラミン酸、N-グリコリルノイラミン酸、9-O-アセチル-N-アセチルノイラミン酸などが含まれる。

*10



【0029】本発明の糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用プライマーとしては、 R_1 、 R_2 および R_3 は任意に組み合わせることができる。

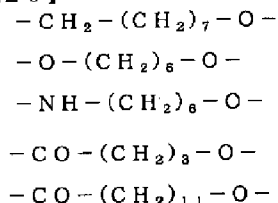
【0030】本発明で用いることのできる高分子担体は、一般式(I)で表される基を結合させることができ、かつ結合後以下で述べるような糖転移酵素の作用により一般式(I)で表される基の糖残基にさらなる糖残基を転移させることのできるものであれば特に制限はなく、例えば、アクリルアミド類、メタクリルアミド類、アクリル酸類、メタクリル酸類、スチレン類、脂肪酸ビニルエステル類などのビニル化合物の重合体または共重合体などが挙げられる。アクリルアミド類としてはアクリルアミド、N-エチルアクリルアミドやN-イソプロピルアクリルアミドなどのN-アルキルアクリルアミドなどが例示される。メタクリルアミド類としては、メタクリルアミド、N-メチルメタクリルアミドやN-エチルメタクリルアミド、N-イソプロピルメタクリルアミドなどのN-アルキルメタクリルアミドなどが例示される。アクリル酸類としては、アクリル酸やアクリル酸メチル、アクリル酸エチル、アクリル酸ヒドロキシエチル、アクリル酸ジメチルアミノエチルなどのアクリル酸エステルなどが例示される。メタクリル酸類としてはメタクリル酸やメタクリル酸メチル、メタクリル酸エチル、メタクリル酸ヒドロキシエチル、メタクリル酸ジメチルアミノエチルなどのメタクリル酸エステルなどが例示される。スチレン類としては、スチレン、p-ヒドロキシスチレン、p-ヒドロキシメチルスチレンなどが例示される。脂肪酸ビニルエステルとしては、酢酸ビニル、酪酸ビニルなどが例示される。また、本発明中の脂肪酸ビニルエステルの重合体あるいは共重合体には、重合反応後アルカリなどによりエステル結合を全部あるいは一部加水分解したものも含まれる。

*50

*【0027】リンカーとしては、アミノ酸残基と単糖残基を結合させることのできるものであれば特に制限はないが、メチレン基1~20個分の長さを有しているものが好ましく、さらに上記一般式(III)(式中、YはO、NHまたはC=Oを示し、かつYを介してアミノ酸残基の側鎖官能基と結合しており、nは1~18の整数を示す)で表される基が好ましい。具体的には、下記に示されるようなものが例示される。

【0028】

【化20】



※【0031】ここでいう高分子担体は水不溶性、水溶性いずれであってもよいが、水溶性の方が好ましい。一般的な分子量は約10000~約5000000であり、好ましくは20000~2000000、より好ましくは50000~1000000である。その形態は、水不溶性担体の場合、ビーズ状、繊維状、膜状、フィルム状などが挙げられるが、特に制限されない。

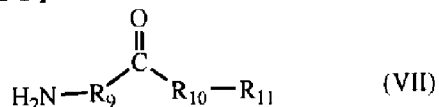
【0032】本発明の高分子担体上に一般式(I)で表される基が結合している糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーは、ラジカル重合やアニオン重合などの手法を用い、一般式(I)で表される基を有する重合性モノマーを重合させたり、他の重合性モノマーと共重合させることにより得ることができ、通常ペルオキソ二硫酸アンモニウムなどを触媒とするラジカル重合で得ることができる。一般式(I)で表される基を有する重合性モノマーとしては、例えば、上記一般式(IV)(式中、 R_4 は炭素数1~18のアルキレン基を示し、 R_5 は特定のプロテアーゼにより開裂できる部位を有するアミノ酸残基あるいはペプチド残基を示し、 R_6 は前記プロテアーゼにより開裂できる部位を含まない任意のペプチド残基であり、その残基中にOH基あるいは酸アミド基にグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したセリン残基、トレオニン残基、グルタミン残基またはアスパラギン残基を含むペプチド残基、あるいは側鎖官能基にリンカーを介してグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したアミノ酸残基を含むペプチド残基を示す)で表されるようなアクリルアミド誘導体などが挙げられる。また、上記重合性モノマーとビニル系モノマーとの共重合比に特に制限はないが、上記重合性モノマー：ビニル系モノマー=1：1~1：100が好ましく、さらに重合性モノマー：ビニル系モノマー=1：4~1：50が好ましい。

21

【0033】また、高分子担体の側鎖官能基に一般式 (I) で表される基を結合させることによって得ることができる。例えば、塩化アクリロイルあるいはN-アクリロキシスクシンイミドとアクリルアミドとの共重合体に一般式 (VII) (式中、R₉は炭素数1~18のアルキレン基を示し、R₁₀は特定のプロテアーゼにより開裂できる部位を有するアミノ酸残基あるいはペプチド残基を示し、R₁₁は前記プロテアーゼにより開裂できる部位を含まない任意のペプチド残基であり、その残基中にOH基あるいは酸アミド基にグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したセリン残基、トレオニン残基、グルタミン残基またはアスパラギン残基を含むペプチド残基、あるいは側鎖官能基にリンカーを介してグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したアミノ酸残基を含むペプチド残基を示す) で表される化合物を反応させることによって得ることができる。

【0034】

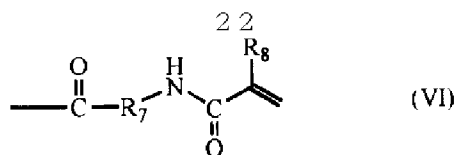
【化21】



【0035】上記一般式 (IV) で表されるアクリルアミド誘導体は、ペプチド自動合成装置を利用して合成することができる。ここでは、R₉が芳香族アミノ酸残基であり、R₁₀が芳香族アミノ酸を含まない任意のペプチド残基であり、その残基中にOH基あるいは酸アミド基にグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したセリン残基、トレオニン残基、グルタミン残基またはアスパラギン残基を含むペプチド残基、あるいは側鎖官能基にリンカーを介してグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したアミノ酸残基を含むペプチド残基である場合について述べる。まず、適当な固相担体上でアミノ酸を伸長させ、芳香族アミノ酸残基を含まない任意のペプチドであり、その残基中にOH基あるいは酸アミド基にグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したセリン残基、トレオニン残基、グルタミン残基またはアスパラギン残基を含むペプチド残基、あるいは側鎖官能基にリンカーを介してグリコシド結合により任意の単糖残基が結合したアミノ酸残基を含むペプチドを固相担体上で合成する。そして、アミノ基が一般式 (VI) (式中、R₇は炭素数1~18のアルキレン基を示し、R₈はHまたはCH₃を示す) で表される基でアシル化された芳香族アミノ酸誘導体を用いてペプチド鎖を伸長させた後、適当な方法で固相担体より伸長させたペプチドの遊離およびペプチド鎖あるいは単糖残基上の保護基を脱離させることにより得ることができる。

【0036】

【化22】



【0037】用いることのできる固相担体としては、ペプチド伸長反応を行うことができ、結合している糖残基の分解なしに固相担体からペプチドを遊離させることができるものであれば特に限定されず、例えば2-クロロトリチル樹脂などが挙げられる。また、ペプチド鎖の伸長はその操作の中で結合している糖残基が分解しない方法であれば特に限定されず、一般的にペプチド自動合成装置で用いられている試薬および方法で行うことができる。例えばFmoc-アミノ酸などのN-保護アミノ酸を用い、DCC法、対称酸無水物法、活性エステル法などの方法により縮合させることにより行うことができる。側鎖官能基にリンカーを介してグリコシド結合で任意の単糖残基が結合したアミノ酸残基をペプチド鎖に導入するときは、通常のN-保護アミノ酸の代わりにOH基がアセチル基などの保護基で保護された単糖残基がリンカーを介して結合した相当するN-保護アミノ酸を用いればよい。アミノ基が一般式 (VI) で表されるで表される基でアシル化された芳香族アミノ酸誘導体も通常のN-保護アミノ酸同様の方法で導入することができる。

【0038】単糖残基が結合したN-保護アミノ酸あるいは側鎖官能基に単糖残基がリンカーを介して結合したN-保護アミノ酸は、一般的な有機合成化学的手法で得ることができる。OH基に単糖残基が結合したN-保護SerあるいはThrは、例えば単糖残基がN-アセチルグルコサミン残基の場合、BF₃・エーテル錯体をプロモーターとしてZ-Ser (アミノ基をベンジルオキシカルボニル基で保護したSer) あるいはZ-Thrとトリ-O-アセチル-N-アセチルグルコサミンを縮合させ、必要に応じてN-保護基をZ基からFmoc基などに変換することにより得ることができる。酸アミド基に単糖残基が結合したN-保護Asnは、例えば単糖残基がN-アセチルグルコサミン残基の場合、トリ-O-アセチル-N-アセチルグルコサミニルアミンとN-保護AspベンジルエステルをN-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキノリン存在下縮合させ、その後ベンジルエステルを水素化分解により除去することにより得ることができる。次いで、単糖残基がN-アセチルグルコサミン残基、リンカーが-NH-(CH₂)₆-O-、アミノ酸残基がAspの場合、N-保護Aspベンジルエステルと6-アミノヘキサノールをN-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキノリン (以下、EEDQと略する) 存在下縮合させた後、2-メチル-(3, 4, 6-トリ-O-アセチル-1, 2-ジデオキシ-α-D-グルコピラノ)-[2, 1-d]-2-オキサゾリンと先に側鎖カルボキ

シル基に6-アミノヘキサノールを縮合させたN-保護 Asp ベンジルエステルを DL-カンファー-10-スルホン酸(以下、CSAと略する)存在下縮合させ、その後ベンジルエステルを水素化分解することにより除去することにより得ることができる。また、単糖残基がN-アセチルグルコサミン残基、リンカーが-CO-(CH₂)₆-O-、アミノ酸残基がLys残基の場合、2-メチル-(3, 4, 6-トリ-O-アセチル-1, 2-ジデオキシ-α-D-グルコピラノ)-[2, 1-d]-2-オキサゾリンと6-ヒドロキシカプロン酸をCSA存在下縮合させた後、ベンジルエステルを水素化分解し、その後適当な縮合剤を用い、N-保護Lysと縮合させることにより得ることができる。さらに、単糖残基がN-アセチルグルコサミン残基、リンカーが-O-(CH₂)₁₂-O-、アミノ酸残基がSerあるいはThr残基の場合、Z-Serベンジルエステル(アミノ基をベンジルオキシカルボニル基で保護したSer)あるいはZ-Thrベンジルエステルと1,2-クロロドデカノールベンジルエステルをNaHなどの強塩基存在下で縮合させた後、接触還元によりZ基およびベンジル基を除去し、アミノ基を再度Fmoc基で保護する。さらに、2-メチル-(3, 4, 6-トリ-O-アセチル-1, 2-ジデオキシ-α-D-グルコピラノ)-[2, 1-d]-2-オキサゾリンとCSA存在下縮合させることにより得ることができる。

【0039】アミノ基が一般式(VI)で表される基でアシル化された重合性芳香族アミノ酸誘導体は、一般的な有機合成化学的な手法で合成することができる。芳香族アミノ酸残基がフェニルアラニンであるときを例に挙げると、フェニルアラニンエチルエステルにω-アクリロイルアミノ脂肪酸を縮合後、エチルエステルを加水分解することにより得ることができる。フェニルアラニンエチルエステルとω-アクリロイルアミノ脂肪酸との縮合は、フェニルアラニンエチルエステルとω-アクリロイルアミノ脂肪酸とを縮合させることができる方法であれば特に制限はなく、通常ペプチド結合形成に用いられる縮合剤、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド、カルボジイミダゾール、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキシキノリン、ジフェニルホスホリルアジドなどの存在下両者を接触させることにより縮合させることができる。

【0040】糖ペプチドを樹脂から遊離させる方法としては、結合している糖残基の分解なしに固相担体からペプチドを遊離させることができる方法であれば特に限定されず、例えば2-クロロトリチル樹脂の場合、50%トリフロロ酢酸、1%1, 2-エタンジチオール、1%チオアニソール、5%フェノールを含むジクロロメタン中室温で数時間反応させることにより遊離させることができる。通常、ペプチドを遊離させる条件でペプチド鎖上のアミノ酸残基の側鎖官能基に結合した保護基も脱離

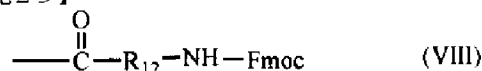
することができる。

【0041】糖残基の保護基は、糖ペプチドを樹脂から遊離させるときに除去できる場合は糖ペプチドの遊離と同時に脱保護を行い、除去できない場合は糖ペプチドを樹脂から遊離させた後、保護基に応じた方法で除去すればよく、例えばアセチル基の場合、糖ペプチドを樹脂から遊離させた後、メタノール中で水酸化ナトリウムなどのアルカリにより加水分解することにより除去することができる。

【0042】一般式(VII)で表される化合物は、一般式(IV)で表されるアクリルアミド誘導体を合成するときに、アミノ基が一般式(VI)で表される基でアシル化された芳香族アミノ酸誘導体の代わりに、例えば一般式(VIII)(式中、R₁₂は炭素数1~18のアルキレン基を示し、Fmocは9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基を示す)で表される基でアシル化された芳香族アミノ酸誘導体を用いることにより得ることができる。

【0043】

【化23】



【0044】本発明の糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法は、(A)上記糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、糖ヌクレオチドの存在下に糖転移酵素を作用させることにより、糖ヌクレオチドより、糖残基を該糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに転移させる工程、および、(B)工程(A)で得た糖残基が転移した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、特定のプロテアーゼを作用させて、糖鎖が伸長した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを遊離させる工程を含む。

【0045】また、本発明の糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを製造する方法は、(A)上記糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、糖ヌクレオチドの存在下に糖転移酵素を作用させることにより、糖ヌクレオチドより、糖残基を該糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに転移させる工程、(B)工程(A)を1回または2回以上繰り返して、糖鎖を伸長させる工程、(C)必要に応じて、副生したヌクレオチド類や未反応の糖ヌクレオチド類を除去する工程、および、(D)工程(A)ないし工程(C)を複数回、繰り返した後、複数の糖残基が転移して糖鎖が伸長した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチド合成用高分子プライマーに、特定のプロテアーゼを作用させて、糖鎖が伸長した糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドを遊離させる工程を含む。

【0046】糖ヌクレオチドより高分子プライマーへの糖の転移は、通常高分子プライマーと糖ヌクレオチドと

を含む中性の緩衝液中で、10～60℃、好ましくは20～40℃で、1～120時間、好ましくは2～72時間、糖転移酵素と接触させることにより行われる。

【0047】本発明で用いる糖転移酵素は、糖ヌクレオチド類を糖供与体として利用できるものであればよく特に限定されない。このような酵素としてLeleir経路の糖転移酵素類が挙げらる。例えば、ガラクトース転移酵素、N-アセチルグルコサミン転移酵素、N-アセチルガラクトサミン転移酵素、フコース転移酵素、シアル酸転移酵素、マンノース転移酵素、キシロース転移酵素、グルクロン酸転移酵素などが挙げられる。

【0048】本発明で用いる糖ヌクレオチド類は、上記酵素が利用できるものであれば特に限定されない。例えば、ウリジン-5'-ジリン酸ガラクトース、ウリジン-5'-ジリン酸-N-アセチルグルコサミン、ウリジン-5'-ジリン酸-N-アセチルガラクトサミン、ウリジン-5'-ジリン酸グルクロン酸、ウリジン-5'-ジリン酸キシロース、グアノシン-5'-ジリン酸フコース、グアノシン-5'-ジリン酸マンノース、シチジン-5'-モノリン酸-N-アセチルノイラミン酸およびこれらのナトリウム塩などが挙げられる。

【0049】また、反応液中には必要に応じて金属塩を添加してもよい。添加できる金属イオンとしては、例えば、マグネシウム、マンガン、コバルト、ニッケル、銅、亜鉛などがあり、通常塩化物等の形で添加することができる。

【0050】必要に応じて副生したヌクレオチド類や未反応の糖ヌクレオチド類などを除去する方法は、高分子プライマーとヌクレオチド類および糖ヌクレオチド類などを分離できる方法であれば特に限定されない。例えば、水溶性高分子プライマーの場合はゲルろ過クロマトグラフィーなどにより、また、水不溶性高分子プライマーの場合は高分子プライマーを水あるいは適当な緩衝液で洗浄することにより除去することができる。

【0051】糖鎖の伸長したプライマーからの糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドの遊離は、用いるプロテアーゼに応じて適した条件で行えばよく、例えばα-キモトリプシンを用いる場合、中性の緩衝液中で、10～60℃、好ましくは20～40℃で、1～72時間、好ましくは2～24時間、接触させることにより行われる。得られた糖ペプチドあるいはネオ糖ペプチドは、各種カラムクロマトグラフィーなどの一般的な精製方法により分離精製することができる。

【0052】

【実施例】以下に、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はかかる実施例に限定されるものではない。

【0053】参考例1 6-アクリロイルアミノカプロン酸の合成

6-アミノカプロン酸30.0gを1.27M水酸化ナ

トリウム水溶液180mlに溶解し、塩化アクリロイル23.2mlを10mlのテトラヒドロフランに溶かしたものを氷冷下で滴下した。このとき、pH8～9になるように4N水酸化ナトリウム水溶液を用いて調整した。滴下後、徐々に室温に戻しながら2時間撹拌した。次いで、反応液に1N塩酸をpH3になるまで加えた後、酢酸エチルで生成物を抽出した。抽出液を水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。硫酸マグネシウムをろ別し、ろ液を減圧濃縮した。残渣を少量の酢酸エチルに溶かし、ヘキサンで再結晶し、目的物13.0gを得た。

【0054】参考例2 N-(6-アクリロイルアミノカプロイル)フェニルアラニンエチルエステルの合成
フェニルアラニンエチルエステル塩酸塩1.15gと参考例1で得た6-アクリロイルアミノカプロン酸1.11gをジメチルホルムアミド(以下、DMFと略する)15mlに溶解し、氷冷下撹拌しながらジフェニルホスホリアジド1.65gを溶かしたDMF15mlを加え、さらにトリエチルアミン1.11gを溶かしたDMF15mlを滴下した。氷冷下4時間反応させた後、室温で24時間反応させた。反応後、ベンゼン：酢酸エチル=1:1の混合溶媒450mlを加え、5%塩酸、水、飽和食塩水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水の順に有機層を洗浄した。無水硫酸ナトリウムで有機層を乾燥させた後、減圧濃縮し、残渣をベンゼンで再結晶し、目的物1.35gを得た。

【0055】参考例3 N-(6-アクリロイルアミノカプロイル)トリプトファンエチルエステルの合成
フェニルアラニンエチルエステル塩酸塩1.15gの代わりにトリプトファンエチルエステル塩酸塩1.34gを用いて、参考例2と同様に行い、目的物1.44gを得た。

【0056】実施例1 N-(6-アクリロイルアミノカプロイル)フェニルアラニンの合成
1N水酸化ナトリウムを含むメタノール50ml中に参考例2で得たN-(6-アクリロイルアミノカプロイル)フェニルアラニンエチルエステル0.72gを加え、室温で4時間撹拌した。反応後、H⁺型陽イオン交換樹脂Dowex50W(ダウケミカル社製)を加え中和した後、ろ過によりイオン交換樹脂を除き、ろ液を減圧乾固し、目的物0.65gを得た。

【0057】実施例2 N-(6-アクリロイルアミノカプロイル)トリプトファンの合成
参考例2で得たN-(6-アクリロイルアミノカプロイル)フェニルアラニンエチルエステル0.72gの代わりに、参考例3で得たN-(6-アクリロイルアミノカプロイル)トリプトファンエチルエステル0.8gを用いて、実施例1と同様に行い、目的物0.73gを得た。

【0058】参考例4 2-メチルー(3,4,6-ト

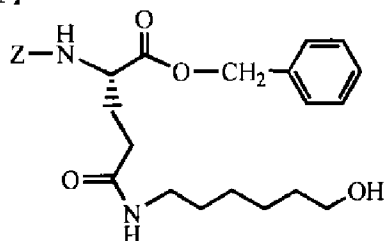
リー-O-アセチル-1, 2-ジデオキシ- α -D-グルコピラノ)-[2, 1-d]-2-オキサゾリンの合成
2-アセトアミド-1, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル-2-デオキシ-D-グルコピラノシド6.0gを1, 2-ジクロロエタン40mlに溶かし、ここにトリメチルシリルトリフロメタンスルホン酸3.2mlを加え、50℃で7時間撹拌しながら反応させた。反応後、室温まで冷却した後、トリエチルアミン10.8mlを加えた。反応液を減圧濃縮し、これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出液：トルエン：酢酸エチル：トリエチルアミン=100：200：1）を用いて目的物を分離し目的物を5.0g得た。

【0059】参考例5 N-ベンジルオキシカルボニルグルタミン酸 α -ベンジルエステル γ -6-ヒドロキシヘキシルアミドの合成

N-ベンジルオキシカルボニルグルタミン酸ベンジルエステル3.7gと6-アミノヘキサノール1.3gをベンゼン：エタノール=1：1の混合溶媒20mlに溶解し、EEDQ2.5gを加えて、室温で24時間撹拌した。反応後、反応液を減圧乾固し、残渣をベンゼンで再結晶し、目的物4.0gを得た。N-ベンジルオキシカルボニルグルタミン酸 α -ベンジルエステル γ -6-ヒドロキシヘキシルアミドは下記構造式（式中、Acはアセチル基、Zはベンジルオキシカルボニル基を示す）を有する。

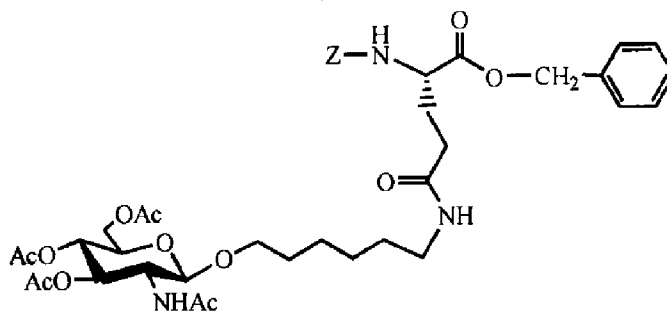
【0060】

【化24】



30

*



【0063】参考例7 N-(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)グルタミン酸 γ -6-O-(3', 4', 6'-トリ-O-アセチル-N-アセチルグルコサミニル)ヘキシルアミドの合成

参考例6で得たN-ベンジルオキシカルボニルグルタミン酸 α -ベンジルエステル γ -6-O-(3', 4', 6'-トリ-O-アセチル-N-アセチルグルコサミニル)ヘキシルアミド1.6gをメタノール50mlに溶解させ、10%パラジウム-炭素100mgを加え、水素気流下50℃で6時間撹拌した。反応後触媒をろ別し、反応液を減圧濃縮し、残渣をベンゼン：エタノール=1：1の混合溶媒100mlに溶解し、ここにトリエ

*【0061】参考例6 N-ベンジルオキシカルボニルグルタミン酸 α -ベンジルエステル γ -6-O-(3', 4', 6'-トリ-O-アセチル-N-アセチルグルコサミニル)ヘキシルアミドの合成

参考例4で得た2-メチル-(3, 4, 6-トリ-O-アセチル-1, 2-ジデオキシ- α -D-グルコピラノ)-[2, 1-d]-2-オキサゾリン1.3gと参考例5で得たN-ベンジルオキシカルボニルグルタミン酸 α -ベンジルエステル γ -6-ヒドロキシヘキシルアミド3.8gをジクロロエタン25mlに溶解させ、70℃に保ちながらCSAをpH2~3になるまで加えた。30分間反応させた後、室温まで冷却し、反応液をクロロホルムで希釈して飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で2回洗浄した。有機溶媒層を無水硫酸マグネシウムで一晩乾燥させた。セライトろ過により硫酸マグネシウムを除去し、ろ液を減圧濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー（移動相：クロロホルム）で目的物2.0gを単離した。N-ベンジルオキシカルボニルグルタミン酸 α -ベンジルエステル γ -6-O-(3', 4', 6'-トリ-O-アセチル-N-アセチルグルコサミニル)ヘキシルアミドは下記構造式（式中、Acはアセチル基、Zはベンジルオキシカルボニル基を示す）を有する。

【0062】

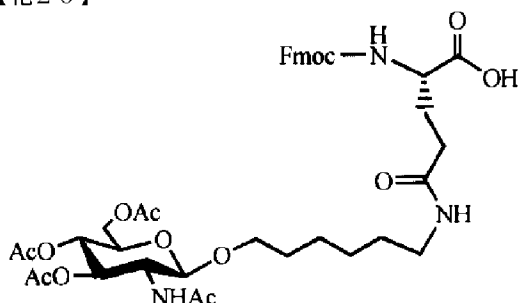
【化25】

※6'-トリ-O-アセチル-N-アセチルグルコサミニル)ヘキシルアミド1.6gをメタノール50mlに溶解させ、10%パラジウム-炭素100mgを加え、水素気流下50℃で6時間撹拌した。反応後触媒をろ別し、反応液を減圧濃縮し、残渣をベンゼン：エタノール=1：1の混合溶媒100mlに溶解し、ここにトリエ

チルアミン0.25gを加え、ここに9-フルオレニルメチル-N-スクシミジルカーボネート0.68gを溶解させたアセトニトリル5mlを一度に加えた。6時間攪拌後、反応液をろ過し、ろ液を減圧濃縮し、エタノールで再結晶し、目的物1.3gを得た。N-(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)グルタミン酸γ-6-O-(3', 4', 6'-トリ-O-アセチル-N-アセチルグルコサミニル)ヘキシルアミドは下記構造式(式中、Acはアセチル基、Fmocは9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基を示す)を有する。

【0064】

【化26】



20

【0065】参考例8 6-O-(3', 4', 6'-トリ-O-アセチル-N-アセチルグルコサミニル)カプロン酸ベンジルエステルの合成

参考例4で得た2-メチル-(3, 4, 6-トリ-O-アセチル-1, 2-ジデオキシ-α-D-グルコピラノ)-[2, 1-d]-2-オキサゾリン1.3gと6-ヒドロキシカプロン酸ベンジルエステル1.78gをジクロロエタン25mlに溶解させ、70℃に保ちながらCSAをpH2~3になるまで加えた。30分間反応させた後、室温まで冷却し、反応液をクロロホルムで希釈して飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で2回洗浄した。有機溶媒層を無水硫酸マグネシウムで一晩乾燥させた。セライトろ過により硫酸マグネシウムを除去し、ろ液を減圧濃縮した。シリカゲルクロマトグラフィー(移動相:クロロホルム)で目的物1.3gを単離した。

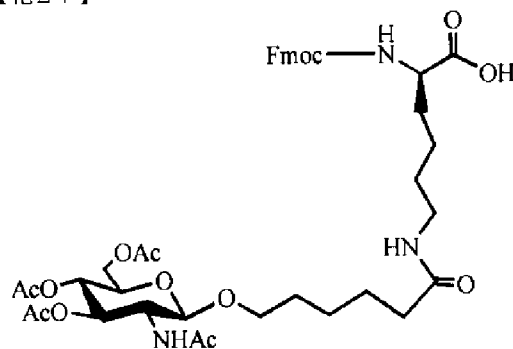
【0066】参考例9 N-α-(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)-N-ε-(6-O-(3', 4', 6'-トリ-O-アセチル-N-アセチルグルコサミニル)カプロイル)リジンの合成

参考例8で得た6-O-(3', 4', 6'-トリ-O-アセチル-N-アセチルグルコサミニル)カプロン酸ベンジルエステル0.55gをメタノール50mlに溶解させ、10%パラジウム-炭素100mgを加え、水素気流下50℃で6時間攪拌した。反応後触媒をろ別し、反応液を減圧濃縮し、残渣をクロロホルム20mlに溶解し、N-ヒドロキシスクシンイミド0.12gを加え、氷冷下ジシクロヘキシルカルボジイミド0.21gを加え、一晩攪拌した。攪拌後、反応液をろ過し、ろ

液を減圧濃縮した。残渣をジメトキシメタン10mlに溶解し、ここにα-N-(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)リジン0.37gを溶解させたジメトキシメタン10mlを加え、室温で1時間攪拌した。水100mlを加え、生じた沈殿を水、10%炭酸水素ナトリウム水溶液、1N塩酸、水の順に洗浄した。乾燥後、エタノールより再結晶し、目的物0.52gを得た。N-α-(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)-N-ε-(6-O-(3', 4', 6'-トリ-O-アセチル-N-アセチルグルコサミニル)カプロイル)リジンは下記構造式(式中、Acはアセチル基、Fmocは9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基を示す)を有する。

【0067】

【化27】



【0068】参考例10 4-ペンテニル-3', 4', 6'-トリ-O-アセチル-N-アセチルグルコサミン

参考例4で得た2-メチル-(3, 4, 6-トリ-O-アセチル-1, 2-ジデオキシ-α-D-グルコピラノ)-[2, 1-d]-2-オキサゾリン3.3gと4-ペンテン-1-オール1.7gを1, 2-ジクロロエタン40mlに溶解し、70℃に保ちながらCSAをpH2~3になるまで加えた。30分間反応させた後、室温まで冷却し、反応液をクロロホルムで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で2回洗浄した。有機溶媒層を無水硫酸マグネシウムで一晩乾燥させた。セライトろ過により硫酸マグネシウムを除去し、ろ液を減圧濃縮した。シリカゲルクロマトグラフィー(移動相:クロロホルム)で目的物2.5gを単離した。

【0069】参考例11 4-O-(3', 4', 6'-トリ-O-アセチル-N-アセチルグルコサミニル)酪酸

過マンガン酸カリウム1.95gを17%酢酸水溶液35mlに溶解し、参考例10で得た4-ペンテニル-3', 4', 6'-トリ-O-アセチル-N-アセチルグルコサミン1.6gにさらに氷酢酸35mlに溶解させたものを氷冷下攪拌しながら滴下し、3時間反応させた。反応後、反応液に酢酸エチル300mlを加え、さ

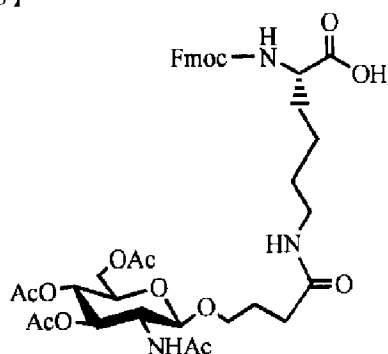
らに硫酸ナトリウム3.16gと1M塩酸35mlを加えて氷冷下撹拌した。有機層を分離し、飽和食塩水で洗浄した後、硫酸マグネシウムを加え乾燥させた。乾燥後、硫酸マグネシウムをろ過により除去し、ろ液を減圧濃縮し目的物1.5gを得た。

【0070】参考例12 $N-\alpha-(9\text{-フルオレニルメチルオキシカルボニル})-N-\epsilon-(4\text{-O-}(3', 4', 6'\text{-トリ-O-アセチル-N-アセチルグルコサミニル})\text{ブタノイル})$ リジンの合成

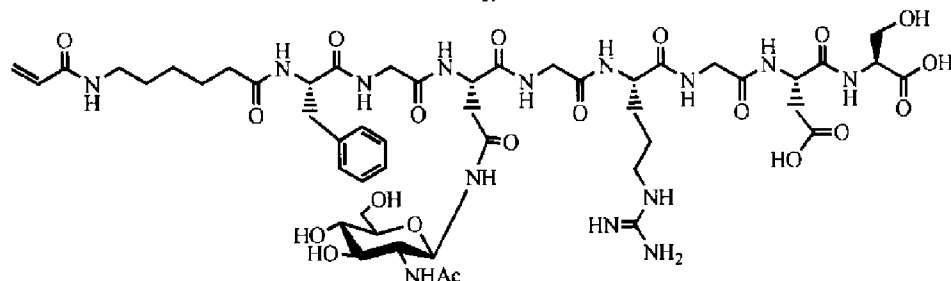
参考例11で得た4-O-(3', 4', 6'-トリ-O-アセチル-N-アセチルグルコサミニル) 10
 酪酸0.43gをクロロホルム20mlに溶解し、N-ヒドロキシスクシンイミド0.12gを加え、氷冷下ジクロヘキシルカルボジイミド0.21gを加えて一晩撹拌した。撹拌後、反応液をろ過し、ろ液を減圧濃縮した。残渣をジメトキシメタン10mlに溶解し、ここにN- $\alpha-(9\text{-フルオレニルメチルオキシカルボニル})$ リジン0.37gを溶解させたジメトキシメタン10mlを加え、室温で1時間撹拌した。水100mlを加え、生じた沈殿を水、10%炭酸水素ナトリウム水溶液、1N塩酸、水の順に洗浄した。乾燥後、エタノールより再結晶し目的物0.56gを得た。N- $\alpha-(9\text{-フルオレニルメチルオキシカルボニル})-N-\epsilon-(4\text{-O-}(3', 4', 6'\text{-トリ-O-アセチル-N-アセチルグルコサミニル})\text{ブタノイル})$ リジンは下記構造式(式中、Fmocは9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基、Acはアセチル基を示す)を有する。

【0071】

【化28】



* 40



【0074】実施例4 アクリルアミド誘導体Bの合成※50※実施例3で用いたプライマーに、Fmoc-Asp(O

*【0072】実施例3 アクリルアミド誘導体Aの合成
 Fmoc-Ser(tBu)をプレロードした2-クロロトリチル樹脂0.44g(樹脂1gあたりSer残基が0.23mmol結合)をプライマーとして、ABI社製A433型ペプチドシンセサイザーを用い、以下に挙げるN-保護アミノ酸を各々1.0mmol、Fmoc/DCC/HOBt法で順次縮合し、目的のアクリルアミド誘導体を固相担体上に合成した。Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Asn(β -Ac₃GlcNAc)-OH、Fmoc-Gly-OH、実施例1で得たN-(6-アクリロイルアミノカプロイル)フェニルアラニン。50%トリフロロ酢酸、1%1, 2-エタンジチオール、1%チオアニソール、5%フェノールを含むジクロロメタン中室温で1時間反応させることによりペプチド残基上の保護基を脱離させるとともに固相担体上からアクリルアミド誘導体を遊離させた。樹脂を別別し、減圧濃縮後酢酸エチル-クロロホルム混合溶媒(1:1)で希釈し、水で有機層を洗浄した。HPLCにより(カラム: YMC-Pack ODS 20mm×250mm、移動相: A:B=100:0(0分)~50:50(60分)、A:0.1%トリフロロ酢酸水溶液、B:0.1%トリフロロ酢酸アセトニトリル溶液、流速: 9.0ml/分)アクリルアミド誘導体を精製した。アクリルアミド画分を凍結乾燥し、得られた固体にナトリウムメトキシド2.2mgを含むメタノール30mlを加え、室温下2時間撹拌した。H⁺型陽イオン交換樹脂Dowex50W(ダウケミカル社製)を加え中和した後、ろ過によりイオン交換樹脂を除き、ろ液を減圧乾固し、目的物であるアクリルアミド誘導体Aを96mg得た。得られたアクリルアミド誘導体Aは下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有する。

【0073】

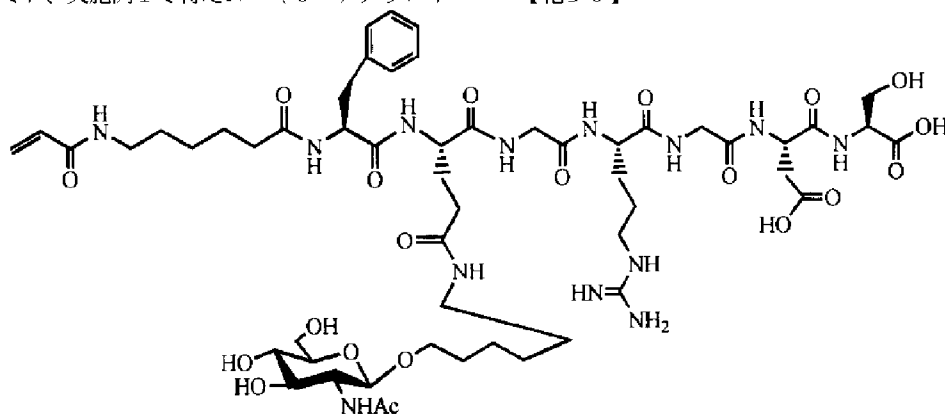
【化29】

tBu)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Gly-OH、参考例7で得たN-(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)グルタミン酸 γ -6-O-(3', 4', 6'-トリ-O-アセチル-N-アセチルグルコサミニル)ヘキシルアミド、実施例1で得たN-(6-アクリロイル*

*ルアミノカプロイル)フェニルアラニンを実施例3と同様の方法で順次縮合し、目的のアクリルアミド誘導体Bを97mg得た。得られたアクリルアミド誘導体Bは下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有する。

【0075】

【化30】

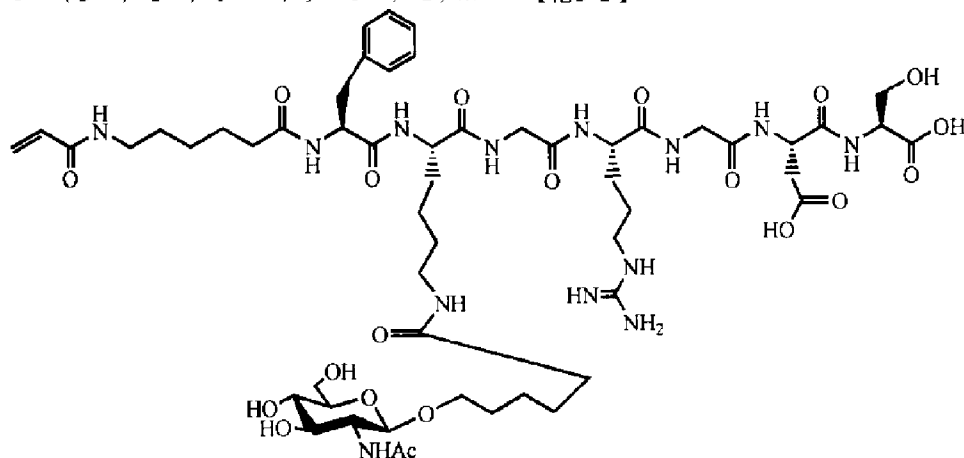


【0076】実施例5 アクリルアミド誘導体Cの合成
参考例7で得たN-(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)グルタミン酸 γ -6-O-(3', 4', 6'-トリ-O-アセチル-N-アセチルグルコサミニル)ヘキシルアミドの代わりに、参考例9で得たN- α -(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)-N- ϵ -(6-O-(3', 4', 6'-トリ-O-アセチル※

※ル-N-アセチルグルコサミニル)カプロイル)リジンを用いて、実施例4と同様の反応を行い、目的物であるアクリルアミド誘導体Cを97mg得た。得られたアクリルアミド誘導体Cは下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有する。

【0077】

【化31】



【0078】実施例6 アクリルアミド誘導体Dの合成
参考例7で得たN-(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)グルタミン酸 γ -6-O-(3', 4', 6'-トリ-O-アセチル-N-アセチルグルコサミニル)ヘキシルアミドの代わりに、参考例12で得たN- α -(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)-N- ϵ -(4-O-(3', 4', 6'-トリ-O-アセチル★

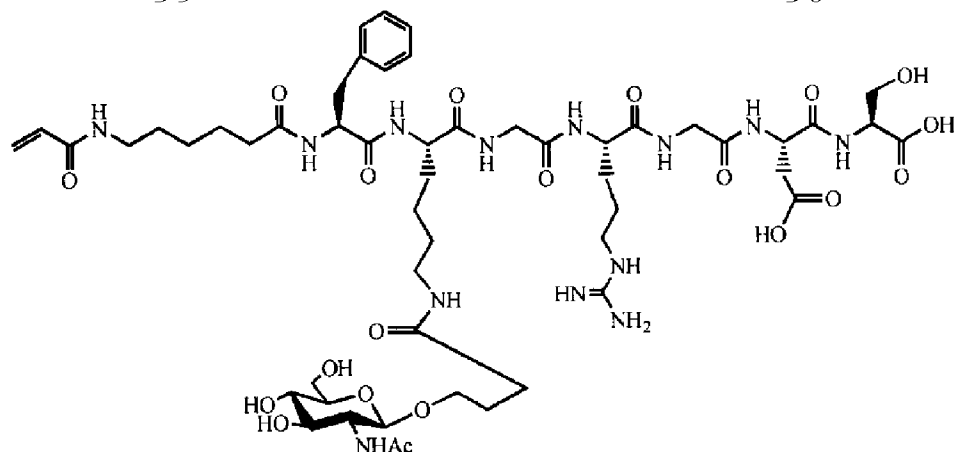
40★チル-N-アセチルグルコサミニル)ブタノイル)リジンを用いて、実施例4と同様の反応を行い、目的物であるアクリルアミド誘導体Dを94mg得た。得られたアクリルアミド誘導体Dは下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有する。

【0079】

【化32】

35

36

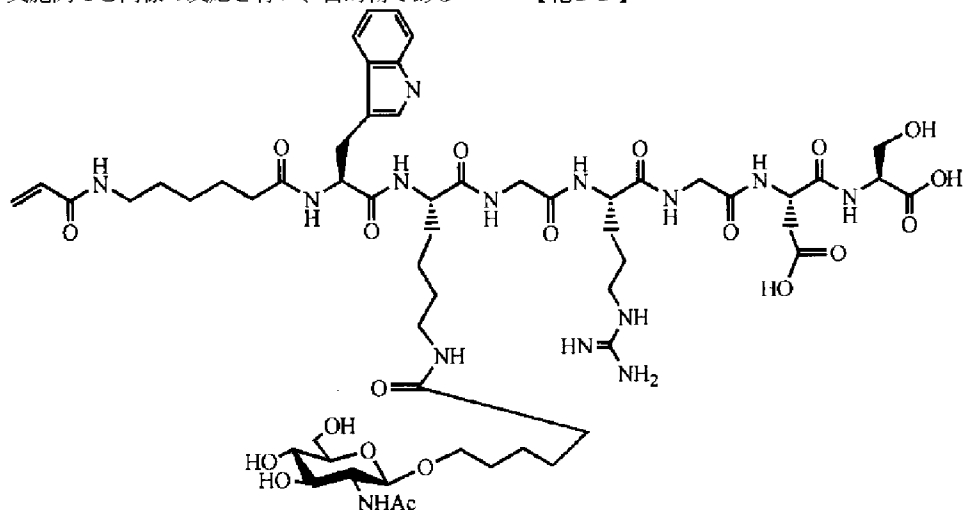


【0080】実施例7 アクリルアミド誘導体Eの合成
 実施例1で得たN-(6-アクリロイルアミノカプロイル)フェニルアラニンの代わりに、実施例2で得たN-(6-アクリロイルアミノカプロイル)トリプトファンを用いて、実施例4と同様の反応を行い、目的物である*

*アクリルアミド誘導体Eを97mg得た。得られたアクリルアミド誘導体Eは下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有する。

【0081】

【化33】

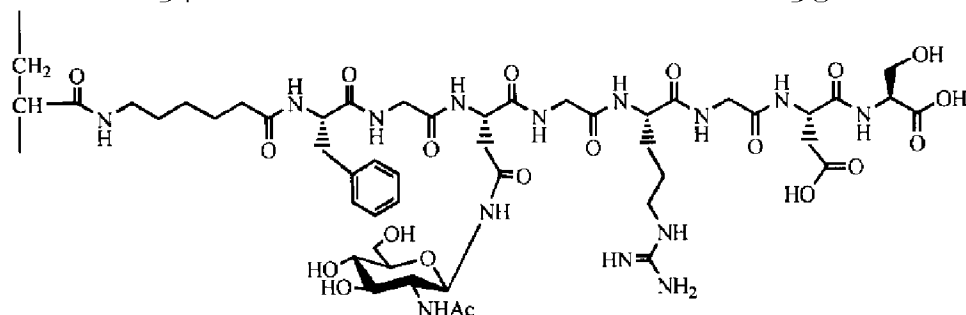


【0082】実施例8 高分子プライマーAの合成
 実施例3で得たアクリルアミド誘導体A60mgをジメチルスルホキシド(以下、DMSOと略する)2mlに溶解させ、これにアクリルアミド35.5mgを水1mlに溶かしたものを加えた。続いて、N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン7.5μl、過硫酸アンモニウム4.5mgを加え、50℃で24時間共重合させた。反応溶液は減圧濃縮し、DMSOを留去してからセファデックスG-25(ファルマシア社製)カ※

※ラムクロマトグラフィー(移動相; 10mM酢酸アンモニウム)で分離し、目的物の溶出画分を凍結乾燥し、目的物である高分子プライマーA(分子量約40000)を90mg得た。得られたポリマー中の糖ペプチドが結合したアクリルアミド誘導体A残基は下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有し、その含有率は9モル%であった。

【0083】

【化34】

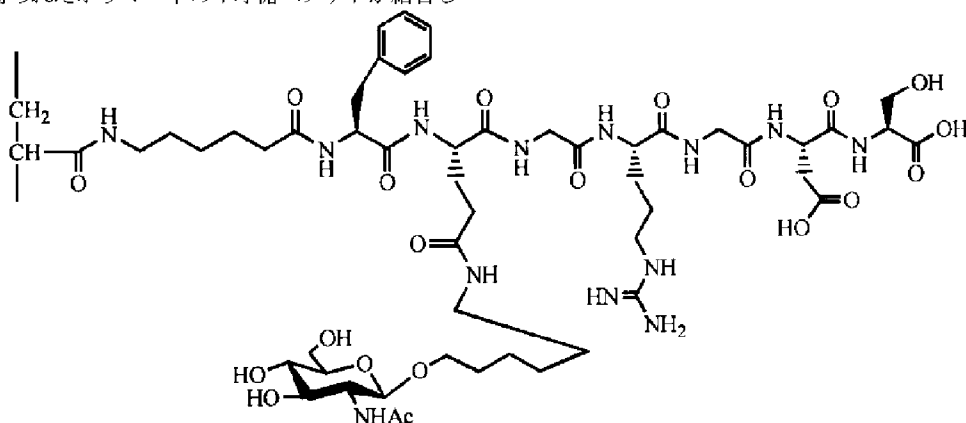


【0084】実施例9 高分子プライマーBの合成
実施例3で得たアクリルアミド誘導体A 60mgの代わりに、実施例4で得たアクリルアミド誘導体B 61mgを用いて、実施例8と同様の反応を行い、目的物である高分子プライマーB（分子量約450000）を91mg得た。得られたポリマー中のネオ糖ペプチドが結合し*

*たアクリルアミド誘導体B残基は下記構造式（式中、Acはアセチル基を示す）を有し、その含有率は9モル％であった。

【0085】

【化35】

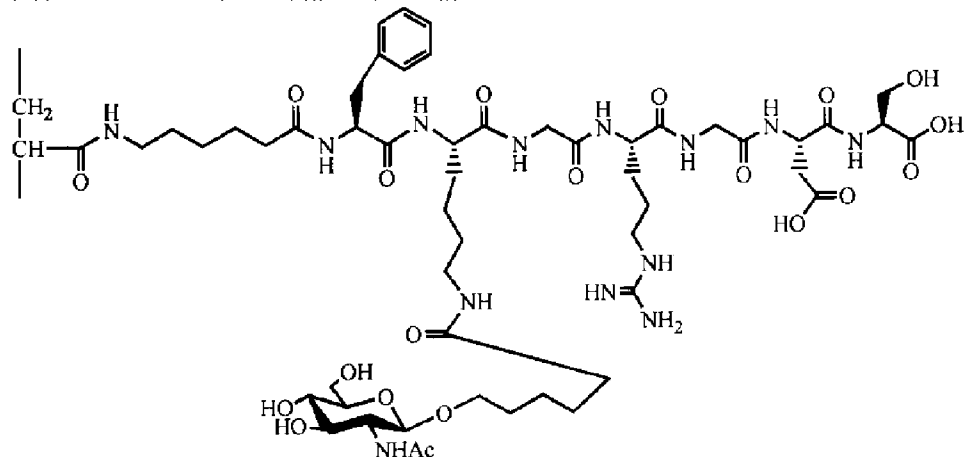


【0086】実施例10 高分子プライマーCの合成
実施例3で得たアクリルアミド誘導体A 60mgの代わりに、実施例5で得たアクリルアミド誘導体C 62.5mgを用いて、実施例8と同様の反応を行い、目的物である高分子プライマーC（分子量約490000）を93mg得た。得られたポリマー中のネオ糖ペプチドが結※

※合したアクリルアミド誘導体C残基は下記構造式（式中、Acはアセチル基を示す）を有し、その含有率は9モル％であった。

【0087】

【化36】



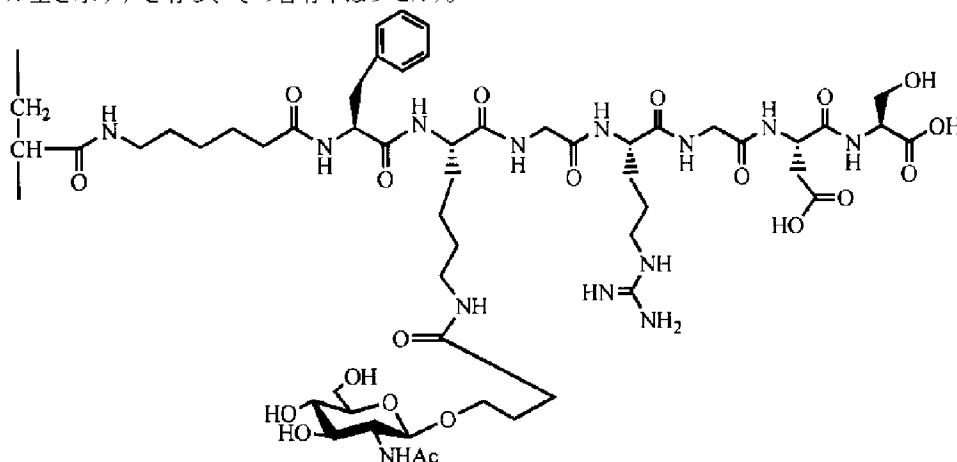
【0088】実施例11 高分子プライマーDの合成
実施例3で得たアクリルアミド誘導体A 60mgの代わ★50に、実施例6で得たアクリルアミド誘導体D 61mgを用いて、実施例8と同様の反応を行い、目的物である

高分子プライマーD（分子量約450000）を91mg得た。得られたポリマー中のネオ糖ペプチドが結合したアクリルアミド誘導体D残基は下記構造式（式中、Acはアセチル基を示す）を有し、その含有率は9モル%*

*であった。

【0089】

【化37】

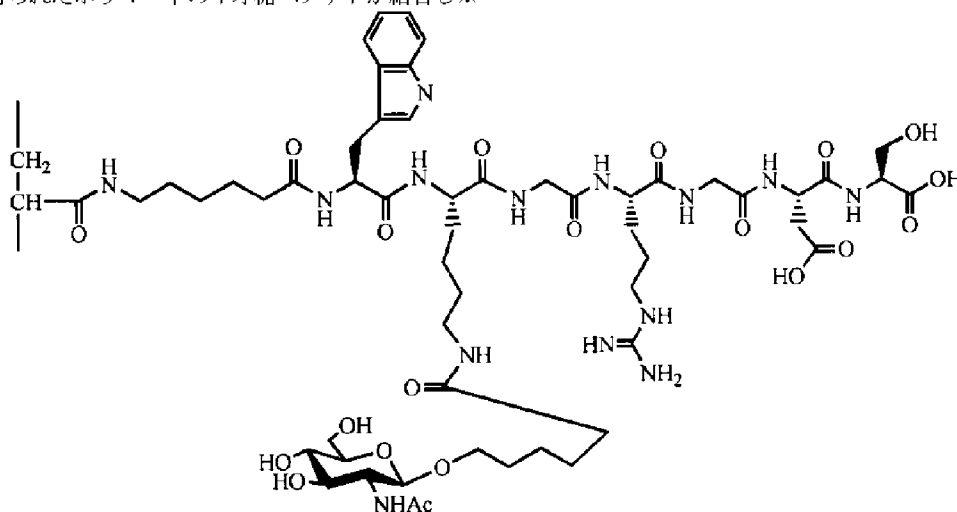


【0090】実施例12 高分子プライマーEの合成
実施例3で得たアクリルアミド誘導体A 60mgの代わりに、実施例7で得たアクリルアミド誘導体E 62mgを用いて、実施例8と同様の反応を行い、目的物である高分子プライマーE（分子量約420000）を91mg得た。得られたポリマー中のネオ糖ペプチドが結合し※

※たアクリルアミド誘導体E残基は下記構造式（式中、Acはアセチル基を示す）を有し、その含有率は9モル%であった。

【0091】

【化38】

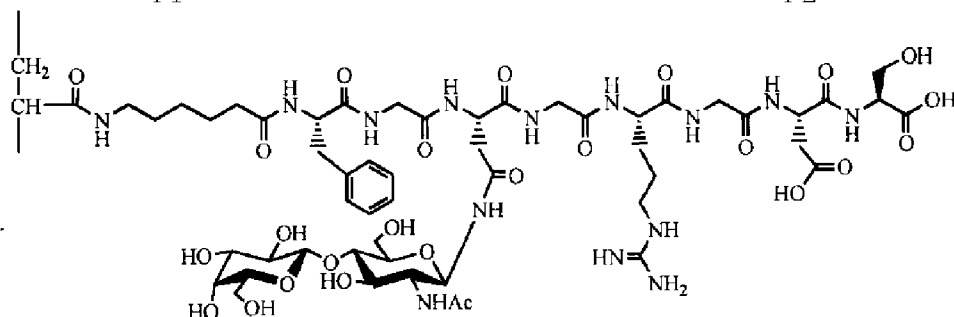


【0092】実施例13 β1, 4-ガラクトース転移酵素による高分子プライマーAへのガラクトースの転移
牛乳由来β1, 4-ガラクトース転移酵素（シグマ社製）1U、ウリジン-5'-ジリン酸ガラクトース二ナトリウム15.9mg、塩化マンガン10mMおよびα-ラクトアルブミン0.26mg/mlを含む50mM HEPES緩衝液（pH7.0）2mlに、実施例8で得た高分子プライマーA 38mgを加え、37℃で48時間反応させた。反応後、反応液からセファデックスG-25（ファルマシア社製）カラムクロマトグラフィ★

40★ー（移動相；10mM酢酸アンモニウム）により生成物画分を分離し、凍結乾燥することにより生成物36mgを得た。得られた生成物のH-NMRスペクトルを測定し、ガラクトースが転移した生成物であることを確認した。ガラクトースが転移したポリマー中の糖ペプチドが結合したアクリルアミド誘導体A残基は下記構造式（式中、Acはアセチル基を示す）を有する。

【0093】

【化39】



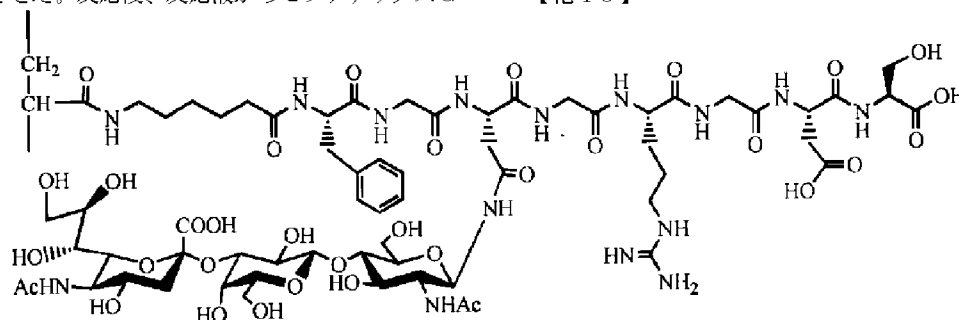
【0094】実施例14 α 2, 3-シアル酸転移酵素による高分子プライマー-AへのN-アセチルノイラミン酸の転移

ラット由来 α 2, 3-シアル酸転移酵素0.1U、シチジン-5'-モノリン酸-N-アセチルノイラミン酸二ナトリウム14mg、ウシ血清アルブミン8mg、塩化マンガン1.2mg、仔ウシ由来アルカリフォスファターゼ20Uを含む50mMカコジル酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)2mlに実施例13で得たガラクトースが転移したプライマーA31mgを加え、37℃で72時間反応させた。反応後、反応液からセファデックスG*

*-25 (ファルマシア社製) カラムクロマトグラフィー (移動相: 10 mM 酢酸アンモニウム) により生成物を分離し、凍結乾燥することにより生成物 27 mg を得た。得られた生成物の ¹H-NMR スペクトルを測定し、N-アセチルノイラミン酸が転移した生成物であることを確認した。N-アセチルノイラミン酸が転移したポリマー中の糖ペプチドが結合したアクリルアミド誘導体 A 残基は下記構造式 (式中、Ac はアセチル基を示す) を有する。

【0095】

【化40】



【0096】実施例15 α 1, 3-フコース転移酵素
による高分子プライマーAへのフコースの転移

ヒト由来 α 1, 3-フコース転移酵素0.08U、グアノシン-5'-ジリン酸フコース二ナトリウム9mg、塩化マンガン15mM、仔ウシ由来アルカリフォスターゼ20Uを含む100mMカコジル酸緩衝液(pH 6.5)に実施例14で得たN-アセチルノイラミン酸が転移したプライマー24mgを加え、37℃で72時間反応させた。反応後、反応液からセファデックスG-40(ファルマシア社製)カラムクロマトグラフィー ※

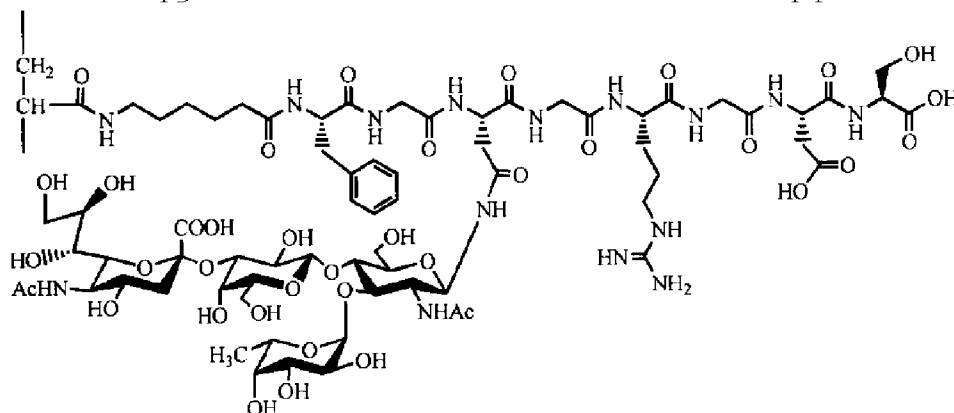
※(移動相: 10 mM酢酸アンモニウム)により生成物を分離し、凍結乾燥することにより生成物20 mgを得た。得られた生成物の¹H-NMRスペクトルを測定し、フコースが転移した生成物であることを確認した。フコースが転移したポリマー中の糖ペプチドが結合したアクリルアミド誘導体A残基は下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有する。

【0097】

【化4 1】

43

44



【0098】実施例16 糖鎖の伸長した高分子プライマーAからの α -キモトリプシンによる糖ペプチドの切り出し

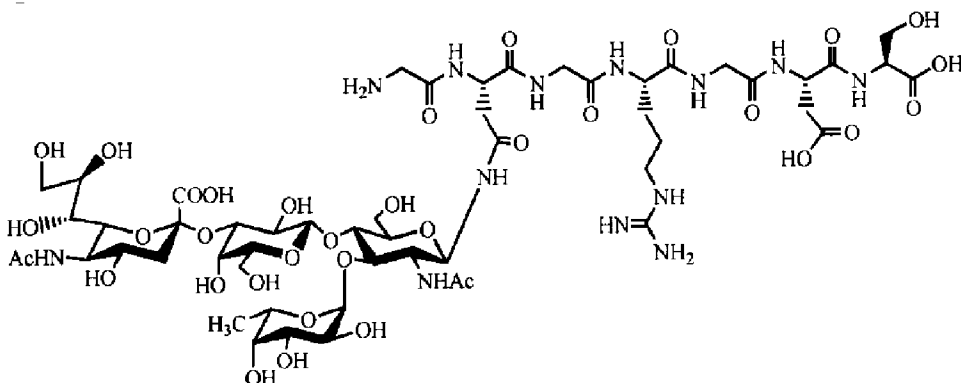
実施例15で得た糖鎖の伸長した高分子プライマーA 20mg、 α -キモトリプシン0.6mgを80mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.8、0.1M塩化カルシウム含有)2mlに溶かし、40℃で24時間反応させた。

反応液をセファデックスG-25(ファルマシア社製)*20

*カラムクロマトグラフィー(移動相:10mM酢酸アンモニウム)により生成物画分を分離し、凍結乾燥することにより生成物12mgを得た。得られた生成物のH-NMRスペクトルを測定し、生成物が下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有することを確認した。

【0099】

【化42】



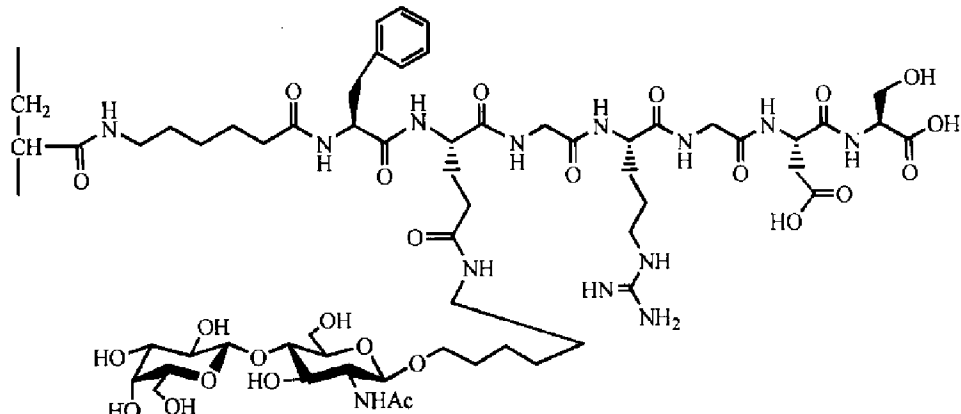
【0100】実施例17 β 1,4-ガラクトース転移酵素による高分子プライマーBへのガラクトースの転移

実施例8で得た高分子プライマーA 38mgの代わりに、実施例9で得た高分子プライマーB 39mgを用いて、実施例13と同様の反応を行い、生成物37mgを得た。得られた生成物のH-NMRスペクトルを測定 ※

※し、ガラクトースが転移した生成物であることを確認した。ガラクトースが転移したポリマー中のネオ糖ペプチドが結合したアクリルアミド誘導体B残基は下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有する。

【0101】

【化43】



【0102】実施例18 α 2,3-シアル酸転移酵素★50★による高分子プライマーBへのN-アセチルノイラミン

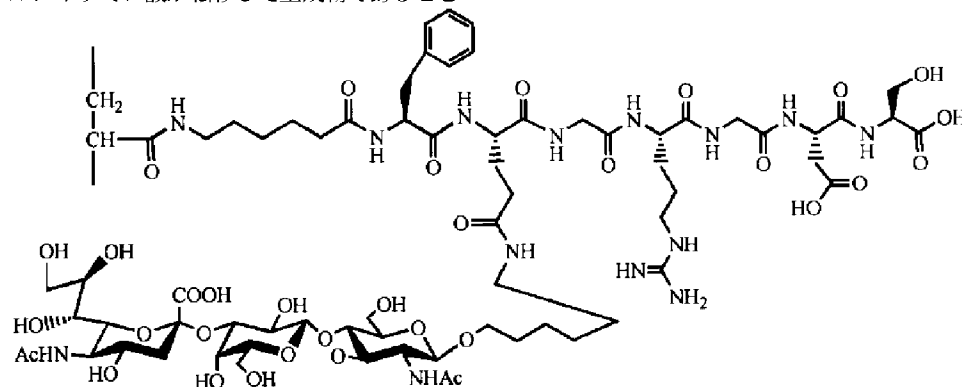
酸の転移

実施例13で得たガラクトースが転移した高分子プライマーA 31 mgの代わりに、実施例17で得たガラクトースが転移した高分子プライマーB 31 mgを用いて、実施例14と同様の反応を行い、生成物27 mgを得た。得られた生成物のH-NMRスペクトルを測定し、N-アセチルノイラミン酸が転移した生成物であること*

*を確認した。N-アセチルノイラミン酸が転移したポリマー中のネオ糖ペプチドが結合したアクリルアミド誘導体B残基は下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有する。

【0103】

【化44】



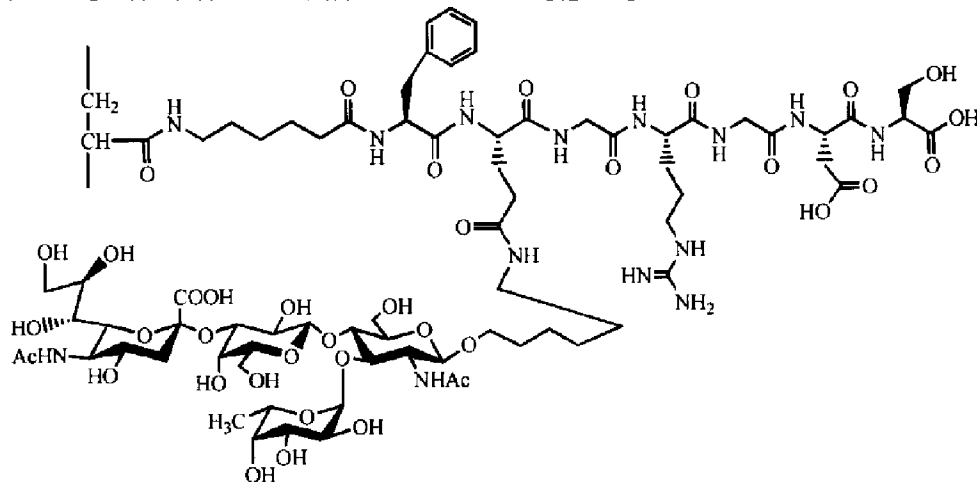
【0104】実施例19 α 1, 3-フコース転移酵素による高分子プライマーBへのフコースの転移

実施例14で得たN-アセチルノイラミン酸が転移した高分子プライマーA 24 mgの代わりに、実施例18で得たN-アセチルノイラミン酸が転移した高分子プライマーB 24 mgを用いて、実施例15と同様の反応を行い、生成物20 mgを得た。得られた生成物のH-NM※

※Rスペクトルを測定し、フコースが転移した生成物であることを確認した。フコースが転移したポリマー中のネオ糖ペプチドが結合したアクリルアミド誘導体B残基は下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有する。

【0105】

【化45】



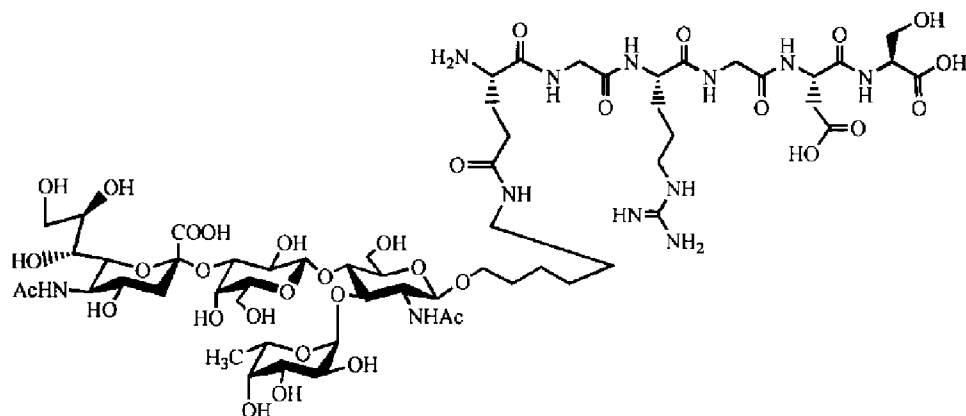
【0106】実施例20 糖鎖の伸長した高分子プライマーBからの α -キモトリプシンによるネオ糖ペプチドの切り出し

実施例15で得た糖鎖の伸長した高分子プライマーA 20 mgの代わりに、実施例19で得た糖鎖の伸長した高分子プライマーB 20 mgを用いて、実施例16と同様★

★の反応を行い、生成物12 mgを得た。得られた生成物のH-NMRスペクトルを測定し、生成物が下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有することを確認した。

【0107】

【化46】

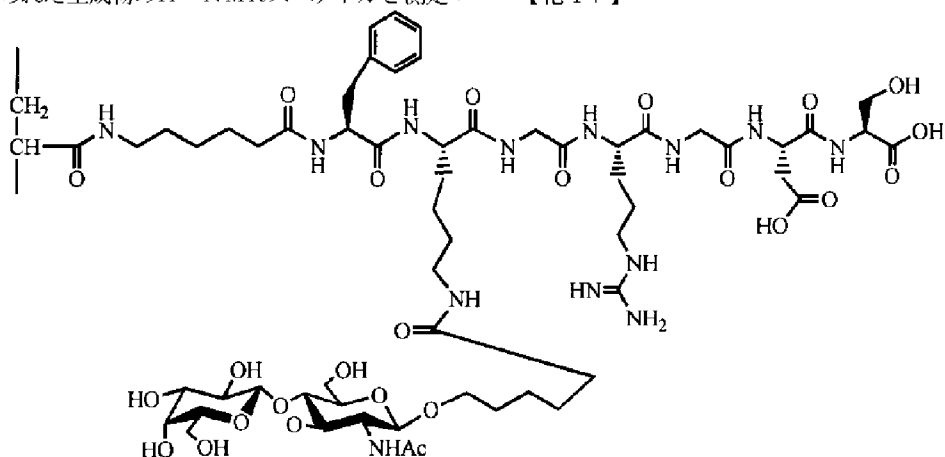


【0108】実施例21 β 1, 4-ガラクトース転移酵素による高分子プライマーCへのガラクトースの転移
実施例8で得た高分子プライマーA38mgの代わりに、実施例10で得た高分子プライマーC39mgを用いて、実施例13と同様の反応を行い、生成物37mgを得た。得られた生成物のH-NMRスペクトルを測定*

*し、ガラクトースが転移した生成物であることを確認した。ガラクトースが転移したポリマー中のネオ糖ペプチドが結合したアクリルアミド誘導体C残基は下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有する。

【0109】

【化47】



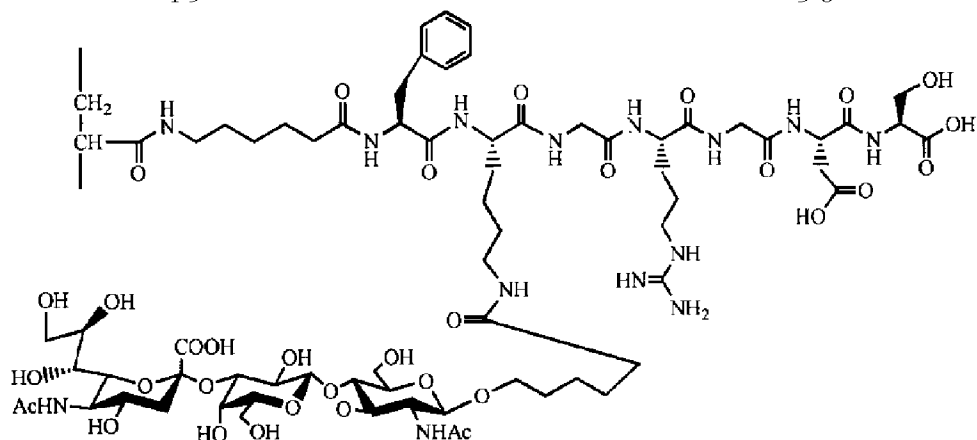
【0110】実施例22 α 2, 3-シアル酸転移酵素による高分子プライマーCへのN-アセチルノイラミン酸の転移

実施例13で得たガラクトースが転移した高分子プライマーA31mgの代わりに、実施例21で得たガラクトースが転移した高分子プライマーC32mgを用いて、実施例14と同様の反応を行い、生成物28mgを得た。得られた生成物のH-NMRスペクトルを測定し、※

※N-アセチルノイラミン酸が転移した生成物であることを確認した。N-アセチルノイラミン酸が転移したポリマー中のネオ糖ペプチドが結合したアクリルアミド誘導体C残基は下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有する。

【0111】

【化48】



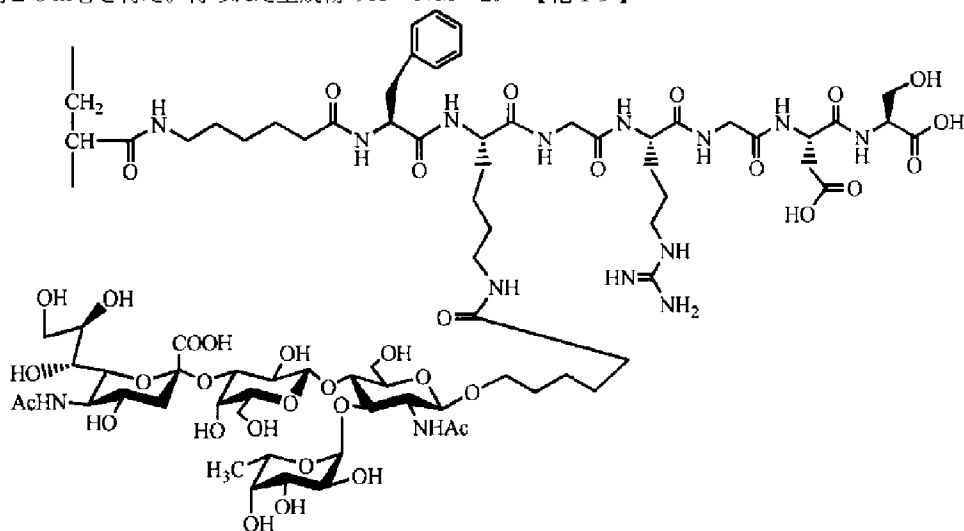
【0112】実施例23 α 1, 3-フコース転移酵素
による高分子プライマーCへのフコースの転移

実施例14で得たN-アセチルノイラミン酸が転移した高分子プライマーA 24 mgの代わりに、実施例22で得たN-アセチルノイラミン酸が転移した高分子プライマーC 24 mgを用いて、実施例15と同様の反応を行い、生成物20 mgを得た。得られた生成物のH-NM* 20

* Rスペクトルを測定し、フコースが転移した生成物であることを確認した。フコースが転移したポリマー中のネオ糖ペプチドが結合したアクリルアミド誘導体C残基は下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有する。

【0113】

【化49】



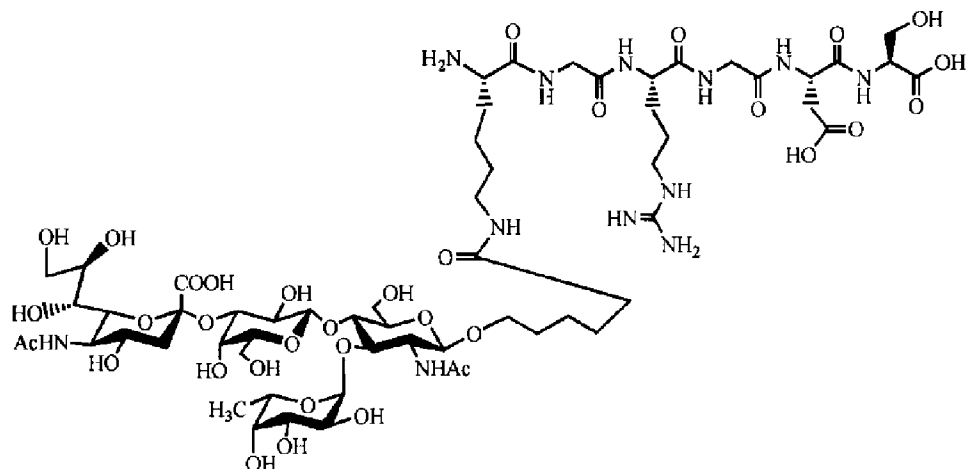
【0114】実施例24 糖鎖の伸長した高分子プライ
マーCからの α -キモトリプシンによるネオ糖ペプチド
の切り出し

実施例15で得た糖鎖の伸長した高分子プライマーA 20 mgの代わりに、実施例23で得た糖鎖の伸長した高分子プライマーC 20 mgを用いて、実施例16と同様※

※の反応を行い、生成物12 mgを得た。得られた生成物のH-NMRスペクトルを測定し、生成物が下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有することを確認した。

【0115】

【化50】

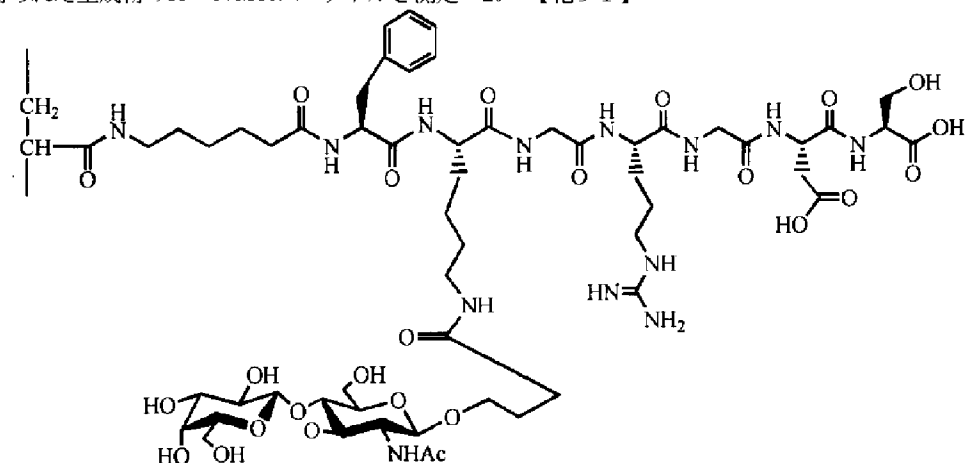


【0116】実施例25 β 1, 4-ガラクトース転移酵素による高分子プライマーDへのガラクトースの転移
実施例8で得た高分子プライマーA38mgの代わりに、実施例11で得た高分子プライマーD39mgを用いて、実施例13と同様の反応を行い、生成物37mgを得た。得られた生成物のH-NMRスペクトルを測定*20

*し、ガラクトースが転移した生成物であることを確認した。ガラクトースが転移したポリマー中のネオ糖ペプチドが結合したアクリルアミド誘導体D残基は下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有する。

【0117】

【化51】



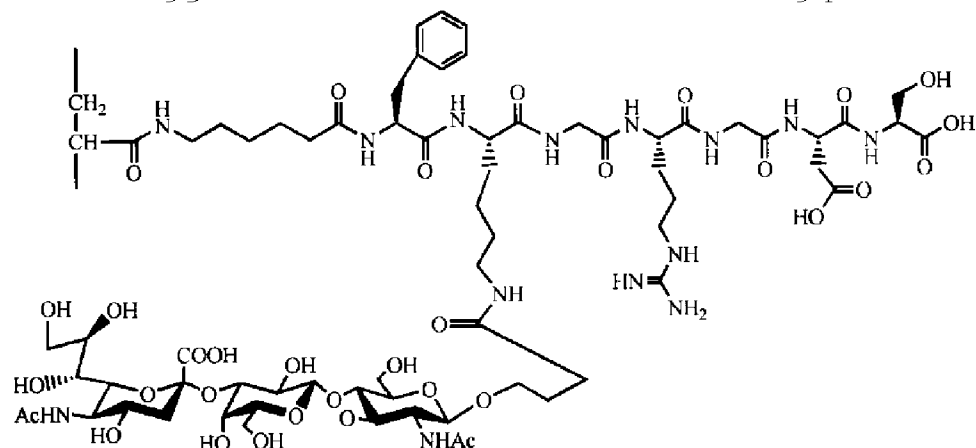
【0118】実施例26 α 2, 3-シアル酸転移酵素による高分子プライマーDへのN-アセチルノイラミン酸の転移

実施例13で得たガラクトースが転移した高分子プライマーA31mgの代わりに、実施例25で得たガラクトースが転移した高分子プライマーD31mgを用いて、実施例14と同様の反応を行い、生成物27mgを得た。得られた生成物のH-NMRスペクトルを測定し、※

※N-アセチルノイラミン酸が転移した生成物であることを確認した。N-アセチルノイラミン酸が転移したポリマー中のネオ糖ペプチドが結合したアクリルアミド誘導体D残基は下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有する。

【0119】

【化52】



【0120】実施例27 α 1, 3-フコース転移酵素

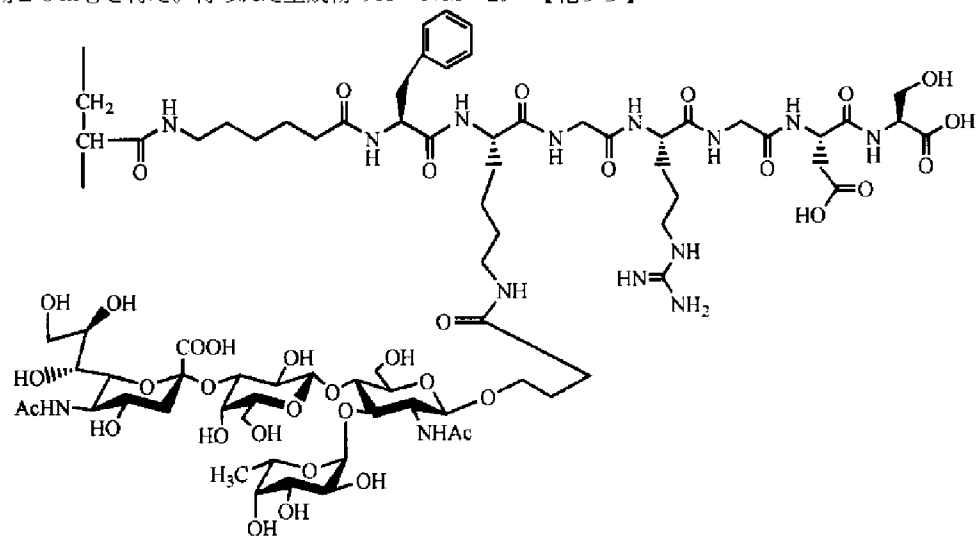
による高分子プライマーDへのフコースの転移

実施例14で得たN-アセチルノイラミン酸が転移した高分子プライマーA 24 mgの代わりに、実施例26で得たN-アセチルノイラミン酸が転移した高分子プライマーD 24 mgを用いて、実施例15と同様の反応を行い、生成物20 mgを得た。得られた生成物のH-NM* 20

* Rスペクトルを測定し、フコースが転移した生成物であることを確認した。フコースが転移したポリマー中のネオ糖ペプチドが結合したアクリルアミド誘導体D残基は下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有する。

【0121】

【化53】



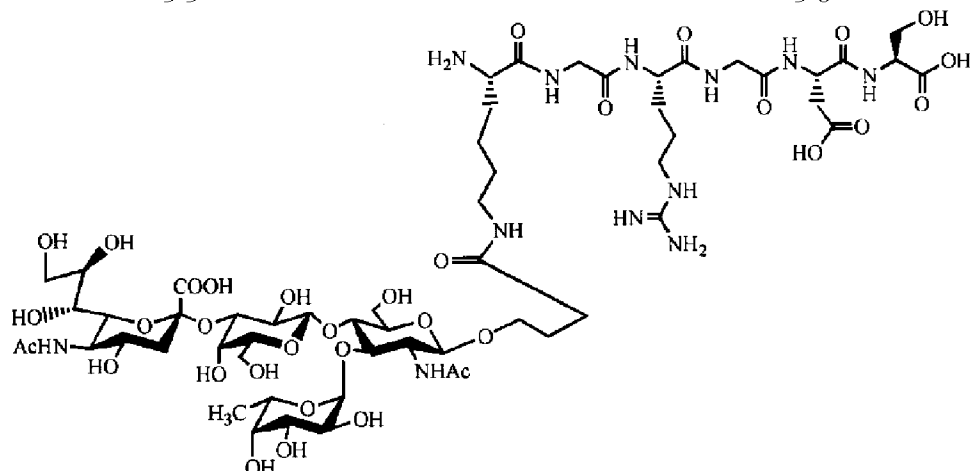
【0122】実施例28 糖鎖の伸長した高分子プライマーDからの α -キモトリプシンによるネオ糖ペプチドの切り出し

実施例15で得た糖鎖の伸長した高分子プライマーA 20 mgの代わりに、実施例23で得た糖鎖の伸長した高分子プライマーD 20 mgを用いて、実施例16と同様※

※の反応を行い、生成物12 mgを得た。得られた生成物のH-NMRスペクトルを測定し、生成物が下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有することを確認した。

【0123】

【化54】

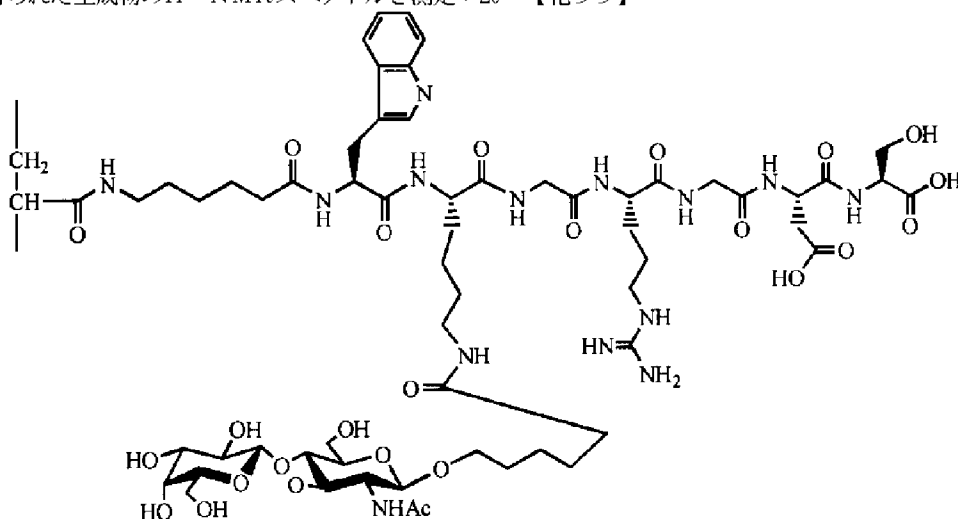


【0124】実施例29 β 1, 4-ガラクトース転移酵素による高分子プライマーEへのガラクトースの転移
実施例8で得た高分子プライマーA 38 mgの代わりに、実施例12で得た高分子プライマーE 40 mgを用いて、実施例13と同様の反応を行い、生成物39 mgを得た。得られた生成物のH-NMRスペクトルを測定*20

*し、ガラクトースが転移した生成物であることを確認した。ガラクトースが転移したポリマー中のネオ糖ペプチドが結合したアクリルアミド誘導体E残基は下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有する。

【0125】

【化55】



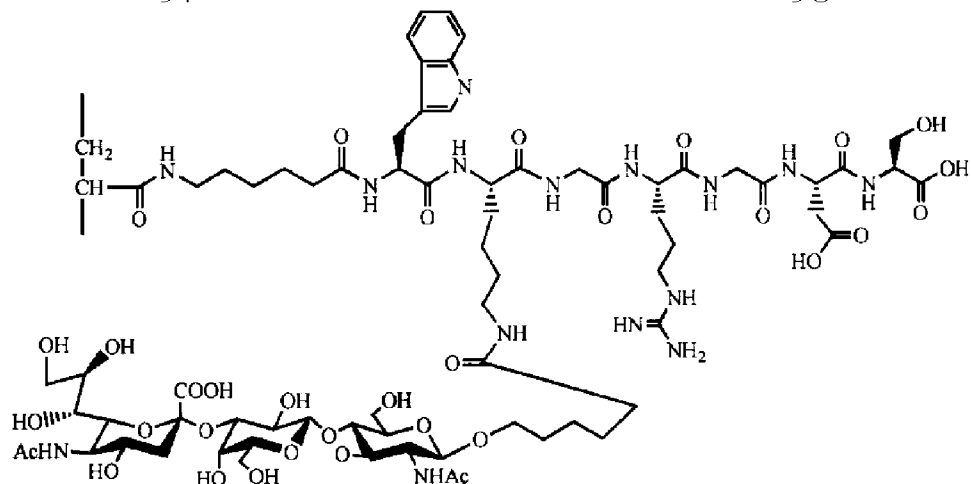
【0126】実施例30 α 2, 3-シアル酸転移酵素による高分子プライマーEへのN-アセチルノイラミン酸の転移

実施例13で得たガラクトースが転移した高分子プライマーA 31 mgの代わりに、実施例25で得たガラクトースが転移した高分子プライマーE 32 mgを用いて、実施例14と同様の反応を行い、生成物28 mgを得た。得られた生成物のH-NMRスペクトルを測定し、※

※N-アセチルノイラミン酸が転移した生成物であることを確認した。N-アセチルノイラミン酸が転移したポリマー中のネオ糖ペプチドが結合したアクリルアミド誘導体E残基は下記構造式(式中、Acはアセチル基を示す)を有する。

【0127】

【化56】



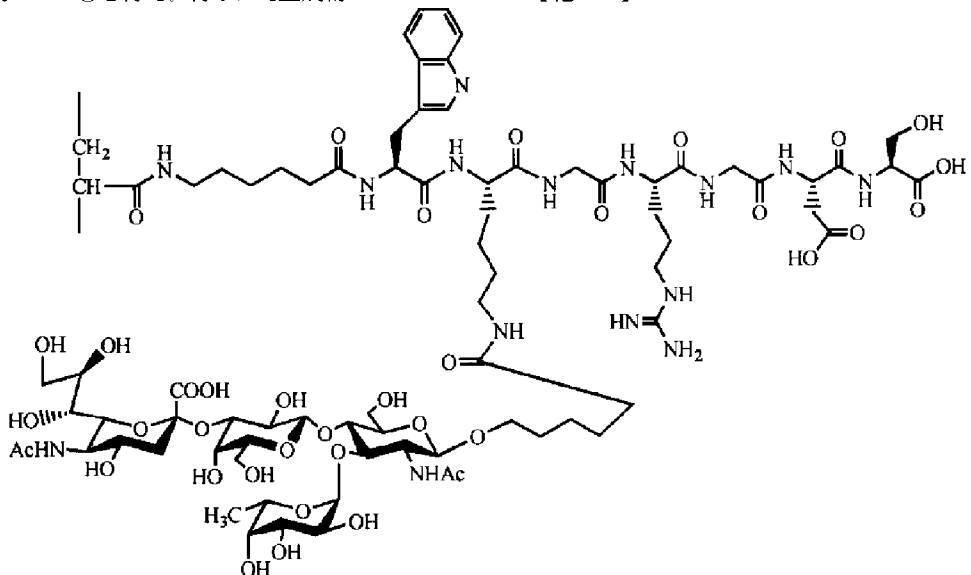
【0128】実施例31 α 1, 3-フコース転移酵素

による高分子プライマーEへのフコースの転移
実施例14で得たN-アセチルノイラミン酸が転移した
高分子プライマーA 24 mgの代わりに、実施例30で
得たN-アセチルノイラミン酸が転移した高分子プライ
マーE 25 mgを用いて、実施例15と同様の反応を行
い、生成物20 mgを得た。得られた生成物のH-NMR*

* Rスペクトルを測定し、フコースが転移した生成物であ
ることを確認した。フコースが転移したポリマー中のネ
オ糖ペプチドが結合したアクリルアミド誘導体E残基は
下記構造式（式中、Acはアセチル基を示す）を有す
る。

【0129】

【化57】



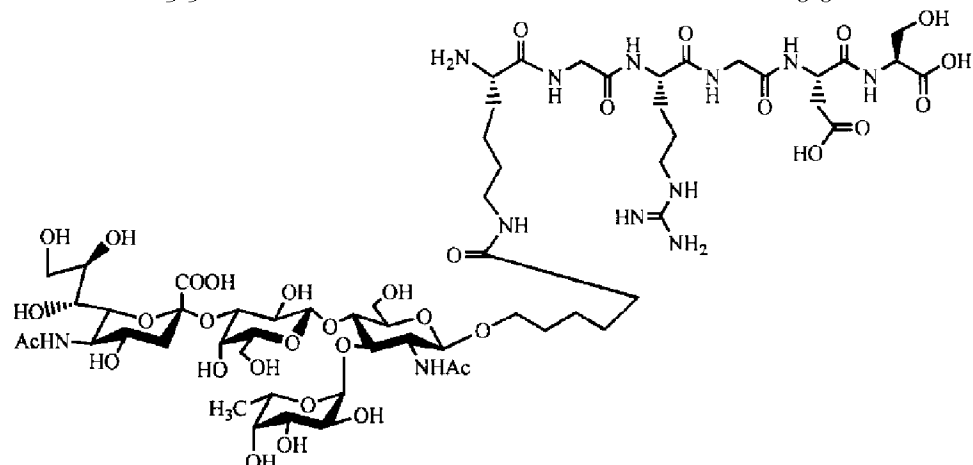
【0130】実施例32 糖鎖の伸長した高分子プライ
マーEからの α -キモトリプシンによるネオ糖ペプチド
の切り出し

実施例15で得た糖鎖の伸長した高分子プライマーA 2
0 mgの代わりに、実施例23で得た糖鎖の伸長した高
分子プライマーE 21 mgを用いて、実施例16と同様※

40※の反応を行い、生成物13 mgを得た。得られた生成物
のH-NMRスペクトルを測定し、生成物が下記構造式
（式中、Acはアセチル基を示す）を有することを確認
した。

【0131】

【化58】



【0132】

【発明の効果】上述したように、本発明における高分子プライマーを用いることにより、糖ペプチドもしくはネ*

* オ糖ペプチドの合成を、従来の方法と比べてきわめて効率的に行うことが可能となった。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁷

C 1 2 P 21/06

識別記号

F I

C 1 2 P 21/06

テマコード(参考)

(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許出願(平成12年度新エネルギー・産業技術総合開発機構「グリコクラスター制御生体分子合成技術」委託研究、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの)

(72)発明者 西村 紳一郎
北海道札幌市中央区北9条西16丁目1-1-302
(72)発明者 山田 久里子
北海道札幌市北区麻生町7丁目1-1-311